



(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 I709648 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：105102831

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 29 日

(51)Int. Cl. : C12N5/02 (2006.01)

C12N5/07 (2010.01)

C12M3/02 (2006.01)

(30)優先權：2015/01/29 日本

JP2015-016045

(71)申請人：國立大學法人東京大學 (日本) THE UNIVERSITY OF TOKYO (JP)

日本

日商索瑪爾股份有限公司 (日本) SOMAR CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：酒井康行 SAKAI, YASUYUKI (JP)；堀口一樹 HORIGUCHI, IKKI (JP)；松永久美子 MATSUNAGA, KUMIKO (JP)；早坂俊二 HAYASAKA, SHUNJI (JP)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 2014/0113372A1

審查人員：吳珮諄

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：9 共 60 頁

(54)名稱

細胞之培養方法、細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及培養基

(57)摘要

本發明提供一種能夠控制細胞之凝集塊之直徑及大量獲得細胞之細胞之培養方法、藉由該方法而獲得之細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及含有該細胞凝集控制劑之培養基。本發明之培養方法等係利用懸浮培養之細胞之培養方法，且包括將抑制上述細胞之細胞接著分子之物質添加至培養基中，而控制上述細胞之細胞凝集之凝集控制步驟。

指定代表圖：

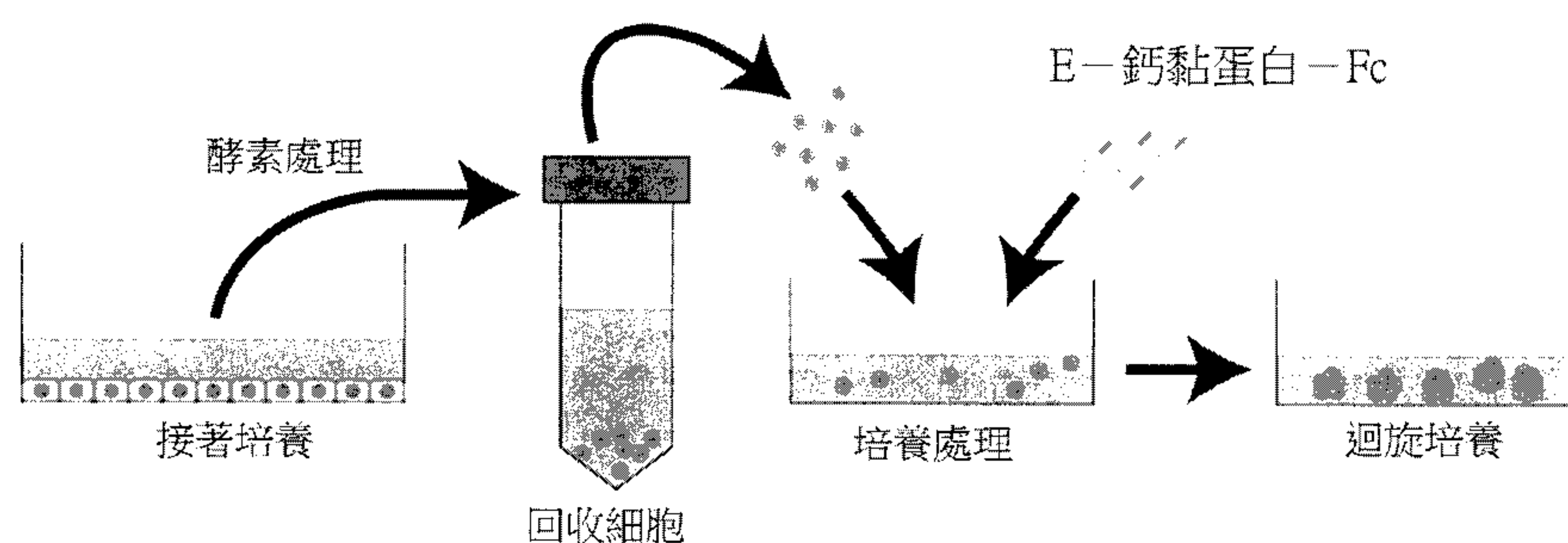


圖1

I709648

發明摘要

※ 申請案號： 105102831

※ 申請日： 105/01/29

※IPC 分類： **G12N 5/02** (2006.01)
G12N 5/07 (2010.01)
G12M 3/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

細胞之培養方法、細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及培養基

【中文】

本發明提供一種能夠控制細胞之凝集塊之直徑及大量獲得細胞之細胞之培養方法、藉由該方法而獲得之細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及含有該細胞凝集控制劑之培養基。本發明之培養方法等係利用懸浮培養之細胞之培養方法，且包括將抑制上述細胞之細胞接著分子之物質添加至培養基中，而控制上述細胞之細胞凝集之凝集控制步驟。

【英文】

無

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

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)

細胞之培養方法、細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及培養基

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種細胞之培養方法、細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及培養基，詳細而言，本發明係關於一種能夠控制細胞之凝集塊之直徑及大量獲得細胞之細胞之培養方法、藉由該方法而獲得之細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及含有該細胞凝集控制劑之培養基。

【先前技術】

【0002】 通常，人類之肝臟約由 2500 億個細胞構成。於使用多能性幹細胞使肝臟組織化之情形時，於認為需要原本之肝臟之 1 成左右之情形時，以細胞數計需要約 250 億個細胞。又，由於在藥物試驗中亦必須以均勻之品質（以下亦稱為「均質」）之細胞進行試驗，故而均質且大量地培養多能性幹細胞之技術為產業上之應用發展上不可或缺之製程。基於此種背景，為了穩定地大量供給多能性幹細胞，就可進行簡便且高密度之培養之方面而言，業界提出有懸浮培養法。該培養方法係被期待為可獲得能夠負荷應用於再生醫療等之細胞數之培養方法之一，尤其於設備方面及成本方面有利。

【0003】 然而，由於多能性幹細胞容易形成凝集體，故而會形成巨大凝集體，或所獲得之凝集體之直徑不均勻等，而形成各種凝集體。又，此

種凝集體有繼代時之細胞生存率低等問題。因此，為了防止培養容器中之細胞及細胞塊沈澱，提出有如下三維懸浮培養法，其伴隨有使用旋轉瓶等之攪拌操作（參照非專利文獻 1 及非專利文獻 2）。然而，由於多能性幹細胞對因攪拌操作所產生之力學性壓力敏感，故而於如下方面存在問題：於培養中有可能會對細胞產生損傷，而產生因壓力所引起之品質降低。

【0004】 因此，最近，提出有於培養袋中含有培養液、甲基纖維素及結冷膠，並於其中培養多能性幹細胞，於繼代時使用尼龍篩網過濾器而使多能性幹細胞球體分解（參照非專利文獻 3）。然而，於該方法中，於所獲得之細胞之數量之方面無法令人滿意。進而，為了利用結冷膠防止細胞及細胞塊之沈澱而使培養液之黏度上升，故而無法進行供給對細胞增殖而言最低限度所需之營養與氧之程度之攪拌，因此於形成為大細胞塊之情形時，有內側之細胞無法生存，而細胞品質降低之問題。又，於欲使所獲得之細胞塊之細胞全部生存而未使細胞塊成長為較大之情形時，有所獲得之細胞數減少之問題。鑒於此種情況，由該培養方法獲得之幹細胞無法同時滿足細胞之質量及所獲得之細胞數之兩者。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

【0005】 非專利文獻 1：BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol. 92, No. 7, 920～933, DECEMBER 30, 2005

【0006】 非專利文獻 2：TISSUE ENGINEERING: Part C Vol. 18, No. 10, 1～13, 2012

【0007】 非專利文獻 3：Stem Cell Reports, Vol. 2, 734～745, May 6, 2014

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0008】 因此，本發明之目的在於提供一種能夠控制細胞之凝集塊之直徑及大量獲得細胞之細胞之培養方法、藉由該方法而獲得之細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及含有該細胞凝集控制劑之培養基。

[解決課題之技術手段]

【0009】 本發明者等進行努力研究，結果發現，藉由在培養基中含有抑制細胞接著分子之物質，能夠控制與凝集體之形成相關之細胞接著分子之功能，及藉此於懸浮培養中控制凝集體之直徑，因此可解決上述課題，從而完成本發明。

【0010】 即，本發明係與細胞之培養方法、細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及培養基相關之以下之[1]至[11]。

[1]一種培養方法，其係利用懸浮培養之細胞之培養方法，其特徵在於：包括下述凝集控制步驟：將抑制上述細胞之細胞接著分子之物質添加至培養基中，而控制上述細胞之細胞凝集。

[2]如上述[1]中所記載之培養方法，其特徵在於：於上述凝集控制步驟中，以含有 10～50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度的方式於上述培養基中添加抑制上述細胞接著分子之物質。

[3]如上述[1]或[2]中所記載之培養方法，其中，抑制上述細胞接著分子之物質係選自細胞接著分子、由細胞接著分子之一部分區域所構成之蛋白質、包含細胞接著分子之全部或一部分區域之融合蛋白質、細胞接著分子

之中和抗體、與細胞接著分子結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種。

[4]如上述[1]至[3]中任一項所記載之培養方法，其特徵在於：抑制上述細胞接著分子之物質含有選自 E-鈣黏蛋白（E-cadherin）、由 E-鈣黏蛋白之一部分區域所構成之蛋白質、包含 E-鈣黏蛋白之全部或一部分區域之融合蛋白質、E-鈣黏蛋白之中和抗體、與 E-鈣黏蛋白結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種。

[5]如上述[1]至[4]中任一項所記載之培養方法，其中，上述細胞為幹細胞或上皮細胞。

[6]一種凝集體，其係藉由上述[1]至[5]中任一項所記載之培養方法而獲得之上述細胞之凝集體，其特徵在於具有均勻之凝集直徑。

[7]如上述[6]中所記載之凝集體，其特徵在於：懸浮培養 48 小時後之凝集體之直徑為 20 μm 以上且未達 1 mm。

[8]一種細胞凝集控制劑，其特徵在於含有抑制細胞接著分子之物質。

[9]如上述[8]中所記載之細胞凝集控制劑，其含有選自 E-鈣黏蛋白、由 E-鈣黏蛋白之一部分區域所構成之蛋白質、包含 E-鈣黏蛋白之全部或一部分區域之融合蛋白質、E-鈣黏蛋白之中和抗體、與 E-鈣黏蛋白結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種作為抑制上述細胞接著分子之物質。

[10]如上述[9]中所記載之細胞凝集控制劑，其特徵在於：上述與 E-鈣黏蛋白結合之肽係由序列編號 3 表示之胺基酸序列所構成之肽。

[11]一種培養基，其特徵在於含有上述[8]至[10]中任一項所記載之細胞凝集控制劑。

[發明之效果]

【0011】 藉由本發明，可提供一種能夠控制細胞之凝集塊之直徑且大量獲得細胞之細胞培養方法、藉由該方法而獲得之細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、及含有該細胞凝集控制劑之培養基。

【圖式簡單說明】

【0012】 圖 1 係表示本發明之培養方法之一實施形態之說明圖。

圖 2 係將實施例 1-1~1-5 及比較例 1-1 中獲得之「以 E-鈣黏蛋白-Fc 之使用量為 0、5、10、20、50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 之範圍分別進行處理，並將人類 iPS 細胞迴旋懸浮懸濁培養 5 天時之凝集體之形狀」，利用相位差顯微鏡拍攝而得之照片圖 ((A) ~ (F))。比例尺表示 500 μm 。

圖 3 係表示由實施例 1-1~1-5 及比較例 1-1 中使用之培養基所測得之細胞之葡萄糖消耗量的圖表。

圖 4 係表示於實施例 1-1~1-5 及比較例 1-1 中培養 5 天並回收之細胞之每 1 ml 培養基之密度的圖表。

圖 5 係將實施例 2-1~2-3 及比較例 2-1 中獲得之「分別利用重組 E-鈣黏蛋白 (10 $\mu\text{g/ml}$)、E-鈣黏蛋白抗體 (16 $\mu\text{g/ml}$)、及 E-鈣黏蛋白-Fc (10 $\mu\text{g/ml}$) 進行處理，以及未添加抑制細胞接著分子之物質而進行處理，並將人類 iPS 細胞迴旋懸浮懸濁培養 1 天時之凝集體之形狀」，利用相位差顯微鏡拍攝而得之照片圖 ((A) ~ (D))。比例尺表示 500 μm 。

圖 6 係將實施例 3-1、3-2 及比較例 3-1 中獲得之「以 E-鈣黏蛋白-Fc 之使用量為 0、50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 之範圍分別進行處理，並將人類 iPS 細胞迴旋懸浮懸濁培養 2 天時之凝集體之形狀」，利用相位差顯微鏡拍攝而

得之照片圖 ((A) ~ (C))。比例尺表示 500 μm 。

圖 7 係將實施例 3-1、3-2 及比較例 3-1 中獲得之「以 E-鈣黏蛋白-Fc 之使用量為 0、50 及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之範圍分別進行處理，並將人類 iPS 細胞迴旋懸浮懸濁培養 5 天時之凝集體之形狀」，利用相位差顯微鏡拍攝而得之照片圖 ((A) ~ (C))。比例尺表示 500 μm 。認為圖 7 (C) 之凝集體之形態係於移液 (pipetting) 時變形者。

圖 8 係表示由實施例 3-1、3-2 及比較例 3-1 中使用之培養基所測得之細胞之葡萄糖消耗量的圖表。

圖 9 係表示於實施例 3-1、3-2 及比較例 3-1 中培養 5 天並回收之細胞之每 1 ml 培養基之密度的圖表。

【實施方式】

【0013】 本發明之培養方法係利用懸浮培養之細胞之培養方法，其特徵在於：包括下述凝集控制步驟：將抑制上述細胞之細胞接著分子之物質添加至培養基中，而控制上述細胞之細胞凝集。又，根據本發明之培養方法，亦能夠藉由均勻地控制凝集體之直徑而大量培養均勻質量之細胞。

【0014】 如以下所詳細說明般，獲得懸浮培養所使用之細胞之方法並無特別限定。又，細胞較佳為具有 E-鈣黏蛋白之細胞，更佳為幹細胞或上皮細胞。

【0015】 作為抑制上述細胞之細胞接著分子之物質，較佳為選自細胞接著分子、由細胞接著分子之一部分區域所構成之蛋白質、包含細胞接著分子之全部或一部分區域之融合蛋白質、細胞接著分子之中和抗體、與細

胞接著分子結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種。上述細胞接著分子更佳為屬於鈣黏蛋白家族之分子。較佳為上述屬於鈣黏蛋白家族之分子為 E-鈣黏蛋白、或為與該分子於結構上具有類似性之分子且包含 E-鈣黏蛋白之 EC1 區以及 EC2 區、EC3 區、EC4 區及 EC5 區中之 1 個以上之區，且與上述多能性幹細胞具有同類親和性之結合能力之分子。

【0016】 又，作為抑制上述細胞之細胞接著分子之物質，更佳為選自 E-鈣黏蛋白、由 E-鈣黏蛋白之一部分區域所構成之蛋白質、包含 E-鈣黏蛋白之全部或一部分區域之融合蛋白質、E-鈣黏蛋白之中和抗體、與 E-鈣黏蛋白結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種。

【0017】 又，亦可於上述凝集控制步驟後，將所獲得之細胞之凝集體於不含抑制上述細胞接著分子之物質之培養基中進行懸浮培養。其原因在於，於上述凝集控制步驟中若將初期之凝集體之直徑控制為均勻，則於其後之培養中即便於不含抑制上述細胞接著分子之物質之培養基中進行懸浮培養，亦可將凝集體之大小控制為均勻。如此，就增加細胞數之觀點而言，較佳為其後於不含抑制上述細胞接著分子之物質之培養基中進行懸浮培養。

【0018】 作為本發明之細胞之培養方法之具體之一實施形態，一面參照圖 1 一面對使用人類 iPS 細胞之一例進行說明，但本發明並不限定於此。首先，為了獲得用於懸浮培養之細胞，藉由酵素處理將接著於作為通常之培養基材之基質凝膠（Matrigel）上之人類 iPS 細胞剝離（圖 1（A））並加以回收（圖 1（B））。作為上述凝集控制步驟，將所回收之 iPS 細胞、與作為抑制 iPS 細胞之細胞接著分子之物質之 E-鈣黏蛋白-Fc 融合蛋白質混

合，並進行懸浮培養，藉此進行細胞彼此之接著抑制處理（圖 1（C））。E—鈣黏蛋白為控制人類 iPS 細胞之細胞間接著之膜蛋白，E—鈣黏蛋白—Fc 融合蛋白質為對 E—鈣黏蛋白之接著區賦予抗體之 Fc 標籤而成之重組蛋白，藉由使 E—鈣黏蛋白—Fc 融合蛋白質接著於人類 iPS 細胞上之 E—鈣黏蛋白接著區，抑制細胞彼此使用 E—鈣黏蛋白之接著。作為其他 E—鈣黏蛋白抑制物質，例如可列舉：重組 E—鈣黏蛋白、E—鈣黏蛋白抗體、E—鈣黏蛋白抑制肽等。該處理時間為 1 天至 2 天左右，於此期間使用振盪器進行迴旋培養。上述處理後，更換為通常之培養液，其後每天進行培養基更換（圖 1（D））。

【0019】 以下詳細地說明用以實施本發明之形態。再者，於本說明書中使用時，所謂用語「多能性幹細胞」，係指藉由活體外（in vitro）培養而保持未分化狀態，能夠進行幾乎永久或長時間之細胞增殖，呈現正常之核（染色體）型，且具有於適當之條件下分化為三胚葉（外胚葉、中胚葉、及內胚葉）所有系譜之細胞之能力的細胞。「多能性幹細胞」為自初期胚胎單離之 ES 細胞、iPS 細胞及其類似細胞，包含自胎兒期之原始生殖細胞單離之 EG 細胞，但並不限定於此。於本說明書中，於表述為「ES 細胞」之情形時，亦存在亦包含「EG 細胞」之情形。

【0020】 於本說明書中使用時，所謂用語「未分化性」，係指於多能性幹細胞中，可藉由至少 1 個以上之未分化標記物例如 ALP 活性或 Oct—3／4 基因（產物）之表現、或各種抗原分子之表現而確認之呈現未分化之狀態之性質。所謂多能性幹細胞之未分化之狀態，係指多能性幹細胞能夠進行幾乎永久或長時間之細胞增殖，呈現正常之核（染色體）型，且具有於

適當之條件下分化為三胚葉所有系譜之細胞之能力的狀態。

【0021】 於本說明書中進行使用時，所謂用語「分化多能性」，係指分化為各種種類之細胞之能力。作為分化細胞，只要為通常可自多能性幹細胞分化誘導之種類之細胞，則對其並無特別限定。具體而言，可列舉：外胚葉細胞或源自外胚葉之細胞、中胚葉細胞或源自中胚葉之細胞、內胚葉細胞或源自內胚葉之細胞等。

【0022】 於本說明書中使用時，所謂用語「培養基」，包括全部可應用於將多能性幹細胞繼代培養之習知方法之液體培養基。

【0023】 本發明之獲得懸浮培養中所使用之細胞之方法並無特別限定，可使用一直以來進行之培養方法。以下對多官能性幹細胞之培養方法進行說明。

【0024】 作為多官能性幹細胞之培養方法，亦可使用下述多能性幹細胞之培養中所使用之方法中之任一種，該方法係：利用培養皿（Dish）或96孔、48孔等微量盤、培養盤等容器之平面培養法、利用燒瓶或袋、反應器等之懸浮培養法等。

【0025】 於進行上述平面培養之情形時，必須於培養皿或培養盤等容器表面設置細胞接著基材。作為此種細胞接著基材，可列舉：瓊脂、明膠、基質凝膠或層黏連蛋白、玻璃連結蛋白（vitronectin）、E-鈣黏蛋白等。該等之使用量只要為培養多能性幹細胞時所使用之濃度，則並無特別限制，作為固定於容器時之水溶液濃度，為2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右。

【0026】 作為將上述接著基材固定或塗覆於上述容器之固相表面之方法，可應用吸附等物理學方法或共價鍵結等化學方法，但就操作之容易

性而言，較佳為利用吸附之方法。所謂吸附，可藉由使含有接著基材之溶液與基材表面接觸一定時間，較佳為數分鐘～一晝夜，更佳為 20 分鐘～12 小時而達成。又，亦可提前人為地使抗原性分子加成、融合接著性分子，利用針對該抗原性分子之與特異抗體之結合。

【0027】 以上述方法製作之培養容器可直接用於多能性幹細胞之通常之培養法。即，只要使適當數量之多能性幹細胞懸浮於通常所使用之液體培養基或細胞培養液中，並將其添加至該培養基材中即可。其後之液體培養基之更換或繼代亦可與習知法同樣地進行。

【0028】 藉由利用上述材料培養多能性幹細胞，可獲得於懸浮培養中所需之數量之多能性幹細胞。細胞基材與細胞之分離及細胞之回收通常係藉由酵素處理而進行。作為此時使用之酵素，可列舉：胰蛋白酶、膠原酶、玻尿酸酶、彈性蛋白酶、鏈蛋白酶等。

【0029】 [抑制細胞接著分子之物質]

本發明之培養方法中所使用之抑制細胞接著分子之物質係與細胞之凝集性相關之能夠抑制細胞接著分子者，如上所述，較佳為細胞接著分子或其衍生物等，更佳為選自 E-鈣黏蛋白、由 E-鈣黏蛋白之一部分區域所構成之蛋白質、包含 E-鈣黏蛋白之全部或一部分區域之融合蛋白質、E-鈣黏蛋白之中和抗體、與 E-鈣黏蛋白結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種。

【0030】 所謂鈣黏蛋白，係與稱為接著結合或黏著連接（adherens junction）之 Ca^{2+} 依賴性之細胞間接著／結合相關之接著分子，作為代表例，已知有 E（上皮）型、N（神經）型、P（胎盤）型 3 種。該等鈣黏蛋白分

子係由 700～750 個胺基酸殘基所構成之膜結合型糖蛋白分子，於其細胞外區域存在 5 個由約 110 個胺基酸殘基所構成之重複結構，被稱為所謂細胞外鈣黏蛋白（EC，Extracellular Cadherin）區之區域。例如，於人類 E-鈣黏蛋白（其胺基酸序列表示於序列編號 1）之情形時，EC1、EC2、EC3、EC4、EC5 之各區分別相當於 157～262、265～375、378～486、487～595、596～700（數值為序列編號 1 所表示之胺基酸序列內之殘基之編號）。又，於小鼠 E-鈣黏蛋白（其胺基酸序列表示於序列編號 2）之情形時，EC1、EC2、EC3、EC4、EC5 之各區分別相當於 159～264、267～377、380～488、489～597、598～702（數值為序列編號 2 所表示之胺基酸序列內之殘基之編號）。該等 EC 區於不同之鈣黏蛋白分子種之間具有同源性，尤其是位於 N 末端側之區（EC1、EC2）之同源性較高。作為呈現此種類似之結構之鈣黏蛋白分子，目前已知有 50 種以上者，將該等分子統稱為鈣黏蛋白家族。以上，作為與鈣黏蛋白相關之總論，參照 Takeichi、Curr. Opin. Cell Biol. 7: 619, 1995；Marrs & Nelson、Int. Rev. Cytol. 165: 159, 1996；Yap et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 119, 1997；Yagi & Takeichi、Genes Dev. 14: 1169, 2000；Gumbiner、J. Cell Biol. 148: 399, 2000 等。

【0031】 又，已知 E-鈣黏蛋白（別名鈣黏蛋白-1）廣泛地表現於肝臟或腎臟、肺等內臟器官之實質細胞或角質形成細胞等上皮細胞，且係承擔其細胞間接著之重要接著分子（作為總論，參照 Mareel et al., Int. J. Dev. Biol. 37: 227, 1993；Mays et al., Cord Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 60: 763, 1995；El-Bahrawy & Pignatelli、Microsc. Res. Tech. 43: 224, 1998；Nollet et al., Mol. Cell. Biol. Res. Commun. 2: 77, 1999 等）。

【0032】 製作屬於 E-鈣黏蛋白之蛋白質之方法並無特別限定，較理想為使用分子生物學方法對重組蛋白質進行製作、精製，並使用其。除此以外，只要為表現出同樣之效果之方法，則亦可使用任一者，例如亦能夠將多能性幹細胞之屬於 E-鈣黏蛋白之蛋白質自活體組織、細胞提取、精製而使用，或以化學方式將該肽合成而使用。

【0033】 例如 E-鈣黏蛋白基因已於人類（序列編號 1）、小鼠（序列編號 2）、大鼠等動物中單離、鑑定，其鹼基序列能夠於 NCBI 等官方 DNA 資料庫中利用（存取編號：（人類）NM_004360；（小鼠）NM_009864；（大鼠）NM_031334）。因此，若為本領域業者，則能夠藉由對 E-鈣黏蛋白基因設計特異之引子或探針，並使用通常之分子生物學方法，而取得並使用 E-鈣黏蛋白基因之 cDNA。又，E-鈣黏蛋白基因之 cDNA 亦可購自理化學研究所基因庫（日本築波）或美國菌種保存中心（ATCC，American Type Culture Collection）、Invitrogen 公司／ResGen 等。作為所使用之編碼屬於鈣黏蛋白家族之蛋白質之基因，較佳為源自與多能性幹細胞所源自之種類同類之動物者，例如，於使用小鼠 ES 細胞實施本發明之情形時，較理想為使用小鼠之 E-鈣黏蛋白 cDNA。然而，亦可使用源自不同類動物者即源自人類或猴、牛、馬、豬、綿羊、或鳥類（例如雞等）、或兩棲類（例如非洲爪蟾等）之 E-鈣黏蛋白 cDNA。

【0034】 用以製作屬於 E-鈣黏蛋白之蛋白質之重組蛋白質之適宜之方法之一例的特徵在於：將編碼該分子之基因導入至 COS 細胞或 293 細胞、CHO 細胞等哺乳動物細胞中而使之表現。較佳為，該基因與廣泛之哺乳動物細胞中之能夠進行基因之轉錄及表現之核酸序列即所謂啟動子序列

以如能夠於該啟動子之控制下轉錄、表現之形態連結。又，較理想為進行轉錄、表現之基因進而與聚 A 附加訊號連結。作為適宜之啟動子，可列舉：源自 SV（Simian Virus）40 病毒或巨細胞病毒（CMV，Cytomegaro Virus）、勞斯肉瘤病毒（Rous sarcoma virus）等病毒之啟動子、或 β -肌動蛋白啟動子、EF（Elongation Factor）1 α 啟動子等。

【0035】 用以製作上述重組蛋白質之基因無需為包含編碼該分子之基因之全長區域者，即便為部分基因序列，該部分序列所編碼之蛋白質或肽分子亦只要為具有與本來之該分子相同程度、或其以上之接著活性者即可。例如，於本發明之適宜之事例中所使用之 E-鈣黏蛋白之情形時，可使用編碼細胞外區域之由自 N 末端側包含 690~710 個胺基酸殘基之部分序列而製作之重組蛋白質即包含 EC1~EC5 區之蛋白質。又，由於通常鈣黏蛋白分子之位於最 N 末端側之區（EC1）規定該分子之結合特異性即同類親和性（Nose et al., Cell 61: 147, 1990），故而亦能夠製作至少包含 EC1 且去除了其以外之 1 個或數個區而成之蛋白質分子而使用。進而，亦可使用與上述蛋白質分子於胺基酸等級方面顯示出 80%以上、較佳為 85%以上、進而較佳為 90%以上、最佳為 95%以上之同源性，且具有接著活性之蛋白質。

【0036】 又，上述重組蛋白質亦能夠以其他蛋白質或肽之融合蛋白質之形式製作。例如，以免疫球蛋白之 Fc 區域或 GST（Glutathione-S-Transferase）蛋白、MBP 蛋白（Mannose-Binding Protein）、抗生物素蛋白、與 His（寡組胺酸）標籤、HA（HemAgglutinin）標籤、Myc 標籤、VSV-G（Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein）標籤等之融合蛋白質之形式製作，並使用蛋白 A/G 管柱或特異性抗體管柱等，藉此可容易並且高效率地進行

重組蛋白質之精製。尤其是 Fc 融合蛋白質由於形成二聚物，故而作為蛋白質之活性較穩定，因此於本發明之實施中較適宜。

【0037】 編碼免疫球蛋白之 Fc 區域之基因已於以人類為代表之哺乳動物體內大量單離並進行鑑定。亦大量地報告有其鹼基序列，例如，包含人類 IgG1、IgG2、IgG3、及 IgG4 之 Fc 區域之鹼基序列之序列資訊能夠於 NCBI 等官方 DNA 資料庫中利用，分別以存取編號：AJ294730、AJ294731、AJ294732、及 AJ294733 進行登錄。因此，若為本領域業者，則能夠藉由對 Fc 區域設計特異之引子或探針，並使用通常之分子生物學方法，而取得並使用編碼 Fc 區域部分之 cDNA。於該情形時，作為所使用之編碼 Fc 區域之基因，關於動物種類或亞型，對其並無特別限定，較佳為與蛋白 A/G 之結合性較強之人類 IgG1 或 IgG2、或小鼠 IgG2a 或 IgG2b 等編碼 Fc 區域之基因。又，亦已知有藉由向 Fc 區域導入變異，而提高與蛋白 A 之結合性之方法(參照 Nagaoka et al., Protein Eng. 16: 243, 2003)，亦可使用藉由該法施加基因改變而成之 Fc 蛋白質。

【0038】 再者，於用以實施本發明之可適宜地使用之 E-鈣黏蛋白之情形時，報告有該重組蛋白質之製作法之一例(參照 Nagaoka et al., Biotechnol. Lett. 24: 1857, 2002；Protein Eng. 16: 243, 2003)。

【0039】 又，將使編碼人類 IgG 之 Fc 區域部分之序列及 His 標籤序列之 cDNA 連結於編碼小鼠或人類之 E-鈣黏蛋白之細胞外區域之 cDNA 而成之融合基因導入至小鼠細胞中，並使其表現而製得之精製重組蛋白質 (Recombinant Human/Mouse E-cadherin-Fc Chimera; R & D systems 公司、Genzyme Techne 公司) 於市面上有販售，亦可用作源自小鼠或人類之 E-鈣

黏蛋白－蛋白質（E－Cad－Fc 蛋白質）。

【0040】 又，製作與 E－鈣黏蛋白等細胞接著分子結合之肽之方法並無特別限定，例如，只要將 E－鈣黏蛋白等細胞接著分子作為標的分子，使用一直以來實施之噬菌體呈現等親和性選擇法（affinity selection）進行篩選即可（例如 Devemy E, Blaschuk O. Identification of a novel N－cadherin antagonist. *Peptides* 2008; 29: 1853－61）。作為具體方法之一例，首先，將選自肽基因庫中之肽放入至預先於培養盤之孔中塗覆有 E－鈣黏蛋白－Fc 融合蛋白質之孔中而進行培養。繼而，為了自孔去除未結合噬菌體而進行洗淨。結合之噬菌體於 2 階段溶出。於第一溶出步驟中係使用含有 2 mM EDTA 之 TBS 而進行，於第二溶出步驟中係利用 0.2 M 之甘胺酸 HCl（pH2.2）進行溶出。對 pH2.2 之溶出液使用 1 M 之 Tris－HCl（pH9.1）進行中和。藉由使 ER2738 細胞感染而使溶出之噬菌體之各組分擴增，並藉由聚乙二醇沈澱而進行精製。自 EDTA 組分擴增之噬菌體係用於第 2 次之生物淘選（biopanning）操作，僅 EDTA 溶出液用於第 3 次之生物淘選操作。又，自酸組分擴增之噬菌體可用於第 2 次之生物淘選操作，僅酸溶出液進行擴增，而用於最終生物淘選操作。於篩選之最後，播種噬菌體，隨機地採集經單離之植株並進行擴增。提取各噬菌體選殖之單鏈 DNA，藉由 DNA 序列推定胺基酸序列。作為與 E－鈣黏蛋白結合之肽，例如可列舉：序列編號 3 之胺基酸序列所表示之 SWELYYP L RANL 或序列編號 4～30 之胺基酸序列所表示之肽等。該等肽可於不失去與標的分子之結合之範圍內進行公知慣用之修飾（例如 PEG 化或 C 末端之醯胺化等）。該等肽可單獨使用，亦可將兩種以上組合而使用。

【0041】 又，製作 E-鈣黏蛋白等細胞接著分子之中和抗體之方法並無特別限定，可使用一直以來實施之公知之方法。亦可將與上述 E-鈣黏蛋白等細胞接著分子結合之肽抗體化而使用。例如可列舉：將細胞接著分子或與細胞接著分子結合之肽作為抗原，使動物免疫而製作之方法；或向動物導入組入至表現載體中之目標蛋白質之基因，並使之於動物之體內表現，將該目標蛋白質作為抗原而製作、回收抗體之方法（DNA 免疫法）等。

【0042】 於本說明書中，所謂細胞接著分子或由 E-鈣黏蛋白之一部分區域所構成之蛋白質，係與細胞接著分子或 E-鈣黏蛋白之親分子相比，缺損有 1 個以上之分子之蛋白質，且係具有細胞接著性者。

【0043】 又，於本說明書中，所謂衍生物，係與親分子相比，其序列呈現 1 個以上之不同之分子，且係具有細胞接著性者。例如可列舉細胞接著分子或 E-鈣黏蛋白之全部或一部分、與其他化學物質或低分子量之聚合物成分或者低聚物成分之反應產物。上述衍生物與親分子之同源性較佳為 75%以上，更佳為 85%以上，進而較佳為 90%以上。

【0044】 [凝集控制步驟]

本發明之培養方法中之凝集控制步驟係下述步驟：將所培養之抑制細胞之細胞接著分子之物質添加至培養基中，而控制上述細胞之細胞凝集。凝集控制步驟只要於容器內放入所需之培養基，使其中含有細胞與抑制細胞接著分子之物質，一面進行靜置或者攪拌等一面進行懸浮培養即可。藉此，能夠以使抑制細胞接著分子之物質作用於細胞表面，成為所需之凝集體之大小之方式控制細胞間接著性。

【0045】 此時之抑制細胞接著分子之物質之添加量係根據細胞之量

或培養基成分而進行適當選擇，尤其以添加抑制細胞接著分子之物質而開始懸浮培養後經過 48 小時後之凝集體之大小（直徑）成為 $20\ \mu\text{m}$ 以上且未達 $1\ \text{mm}$ 之方式進行適當選擇，例如，較佳為以於使用屬於 E-鈣黏蛋白之蛋白質或中和抗體之情形時，成為 $5\sim 100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 之濃度之方式添加，又，以於使用與 E-鈣黏蛋白等細胞接著分子結合之肽之情形時，成為 $0.01\sim 1000\ \mu\text{M}$ 之濃度之方式添加。若添加量少於上述範圍，則存在所獲得之凝集體之大小變得過大之情形，故而存在凝集體之內側之細胞無法生存，或於幹細胞之情形時失去未分化性之情形。又，若超過上述範圍，則存在凝集體之大小變得顯著地不均勻，或較小之凝集體覆蓋較大之凝集體之表面，因此內側之較大之凝集體之細胞無法生存之情形。又，就大量獲得均質之細胞之方面而言，使用屬於 E-鈣黏蛋白之蛋白質或中和抗體之情形時之濃度較佳為 $7\sim 80\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，更佳為 $8\sim 65\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 之範圍，進而較佳為 $10\sim 50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 之範圍，使用與 E-鈣黏蛋白等細胞接著分子結合之肽之情形時之濃度較佳為 $0.1\sim 900\ \mu\text{M}$ ，更佳為 $0.5\sim 800\ \mu\text{M}$ 之範圍，進而較佳為 $1\sim 600\ \mu\text{M}$ 之範圍。若為上述範圍，則可將經過 48 小時後之凝集體之大小控制為 $20\ \mu\text{m}$ 以上且未達 $1\ \text{mm}$ 之範圍。藉由將凝集體控制為該大小，可使最終所獲得之凝集體之大小變得均質，結果使細胞生存率及細胞數增加。認為其原因在於，與如習知般僅使細胞彼此難以接著之方法不同，於本發明中，抑制細胞接著分子之物質直接作用於接著因子，並利用細胞量控制細胞彼此之接著量。

【0046】 進而，關於使用屬於 E-鈣黏蛋白之蛋白質或中和抗體之抑制細胞接著分子之物質的添加量，若因考慮培養基中之蛋白質含量所引起

之蛋白質吸附性，則於使用蛋白質含量較少之培養基（例如蛋白質含量為 1 mg/ml 以下）之情形時，較佳為 25~100 $\mu\text{g/ml}$ 、30~100 $\mu\text{g/ml}$ 、較佳為 40~100 $\mu\text{g/ml}$ 、進而較佳為 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 之範圍，於使用蛋白質含量較多之培養基（例如為 10 mg/ml 以上）之情形時，較佳為 7~80 $\mu\text{g/ml}$ 、更佳為 8~65 $\mu\text{g/ml}$ 、進而較佳為 10~50 $\mu\text{g/ml}$ 之範圍。藉由以此種量添加抑制細胞接著分子之物質，抑制細胞接著分子之物質可於封阻目標之細胞膜鈣黏蛋白前吸附於其他細胞膜或培養基材，而確實地封阻細胞膜鈣黏蛋白。

【0047】 又，添加抑制細胞接著分子之物質時之對細胞之處理時間可根據凝集體之大小而適當決定，通常為 24~48 小時。若短於該期間則存在難以形成凝集體之情形，又，若超過該範圍，則由於凝集體難以增大，故而存在所獲得之細胞數減少之情形。

【0048】 於本發明之培養方法中，就增加細胞數之觀點而言，較佳為如上所述，使於凝集控制步驟中獲得之細胞之凝集體於通常之懸浮培養即不含抑制上述細胞接著分子之物質之培養基中進行懸浮培養。此時，培養結束之標準為所有凝集體之大小成為 250 μm 以上且未達 1 mm、較佳為 250~950 μm 、更佳為 300~750 μm 、進而較佳為 300~600 μm 左右之範圍之時刻。

【0049】 於本發明中，懸浮培養方法只要為於袋或燒瓶、反應器等容器內將細胞懸浮培養之方法，則並無特別限定。若為懸浮培養，則亦可為靜置培養，就對細胞之營養成分賦予性及氧賦予性之方面而言，較佳為於可賦予該等之條件例如伴有攪拌或流動等之條件下進行培養。

作為進行攪拌時之條件，例如較佳為進行 20~150 rpm 左右之攪拌。作為於攪拌以外賦予營養成分或氧之方法，可列舉：使培養液中含有氣體之起泡方法或使培養液回流之方法等。又，作為賦予氧之方法，除上述方法以外，可列舉使培養液中含有血色素而有效率地供給氧之方法等。

【0050】 於本發明之懸浮培養中所使用之培養基並無特別限制，可根據細胞之種類而使用培養細胞時所使用之培養基。以下對用以培養多能性幹細胞之培養基進行詳細說明。作為用以培養多能性幹細胞之液體培養基，只要為可應用於將多能性幹細胞繼代培養之習知方法者，則並無特別限定。作為其具體例，可列舉：Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)、RPMI1640 培養基等，通常，添加 2 mM 左右之麩醯胺及／或 100 μ M 左右之 2-巰基乙醇而使用。又，作為 ES 細胞培養用培養基，亦可使用市售之 KnockOut DMEM (Invitrogen 公司)、或 ES cell-qualified DMEM (Cell & Molecular Technologies 公司)、TX-WES (Thromb-X 公司) 等。較佳為向該等培養基中添加 FBS 5~25% 左右，亦能夠進行無血清培養，例如可替代使用 15~20% 之 KnockOut Serum Replacement (Invitrogen 公司)。又，可使用添加有 MEF 細胞之培養上清液或 bFGF/FGF-2、SCF 等之培養基，其詳細之方法眾所周知(Xu et al., Nature Biotech. 19: 971, 2001；國際公開編號第 01/51616 號；國際公開編號第 03/020920 號；Amit et al., Biol. Reprod., 70: 837, 2004)。作為多能性幹細胞之培養中所使用之液體培養基，除上述以外，可使用杜貝可改良伊格爾培養基 (DMEM, Dulbecco's Modified Eagles's Medium)、DMEM/F12 培養基、麥考伊 5A 培養基 (McCoy's 5A medium)、哈姆 F12 培養基 (Ham's Nutrient Mixture

F12)、MEM 培養基 (Minimum Essential Medium)、 α MEM 培養基 (α MEM, alpha Modified Eagles's Minimum Essential Medium)、伊格爾 MEM 培養基 (EMEM, Eagles's Minimum Essential Medium)、RPMI1640 培養基、IPL41 培養基、伊思考夫改良杜貝可培養基 (IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、威廉培養基 E (William's Medium E)、MCDB131 培養基、Fischer's 培養基、StemPro34 (Invitrogen 公司製造)、StemProhESCSFM (Invitrogen 公司製造)、Sf-900II (Invitrogen 公司製造)、Opti-Pro (Invitrogen 公司製造)、X-VIVO 10 (Cambrex 公司製造)、X-VIVO 15 (Cambrex 公司製造)、HPGM (Cambrex 公司製造)、StemSpan H3000 (Stem Cell Technology 公司製造)、StemSpanSFEM (Stem Cell Technology 公司製造)、mTeSR1 或 2 培養基 (Stem Cell Technology 公司製造)、StemlineII (SigmaAldrich 公司製造)、QBSF-60 (Quality Biological 公司製造)、Essential 8 培養基 (Gibco 公司製造)、MesenPRO RS 培養基 (Gibco 公司製造)、Repro FF 或 Repro FF2 (ReproCELL 公司製造)、PSGro hESC/iPSC 培養基 (System Bioscience 公司製造)、NutriStem 培養基 (Biological Industries 公司製造)、CSTI-7 培養基 (細胞科學研究所公司製造)、MF-Medium 間葉系幹細胞增殖培養基 (Toyobo 公司製造) 等公知慣用之培養基。

【0051】 於使用大量包含以白蛋白作為代表之蛋白質之培養基(例如蛋白質含量為 10 mg/ml 以上)作為培養基之情形時，顯示出藉由培養基中之蛋白質而抑制蛋白質吸附於細胞膜表面或培養基材等之傾向，若使用蛋白質含量較少之培養基 (例如 1 mg/ml 以下)，則顯示出與包含大量蛋白質之培養基相比，產生蛋白質吸附於細胞膜表面或培養基材等之可能性增

高之傾向。

【0052】 又，亦可根據目的向培養基中添加於培養多能性幹細胞時慣用地使用之成分例如鈉、鉀、鈣、鎂、磷、氯、各種胺基酸、各種維生素、抗生素、血清、脂肪酸、糖等。於培養源自動物之細胞及／或組織時，亦可根據目的將其他化學成分或活體成分組合一種以上而添加。

【0053】 作為上述添加至源自動物之細胞及／或組織之培養基中之成分，例如可列舉：胎牛血清、人類血清、馬血清、胰島素、轉鐵蛋白、乳鐵蛋白、膽固醇、乙醇胺、牛血清白蛋白、亞硒酸鈉、單硫甘油、2-巰基乙醇、聚乙二醇、丙酮酸鈉、各種維生素、各種胺基酸、瓊脂、瓊脂糖、膠原蛋白、甲基纖維素、各種細胞介素、各種激素、各種增殖因子、各種細胞外基質、各種細胞接著分子等。

【0054】 作為上述細胞介素，例如可列舉：介白素-1 (IL-1)、介白素-2 (IL-2)、介白素-3 (IL-3)、介白素-4 (IL-4)、介白素-5 (IL-5)、介白素-6 (IL-6)、介白素-7 (IL-7)、介白素-8 (IL-8)、介白素-9 (IL-9)、介白素-10 (IL-10)、介白素 (IL-11)、介白素-12 (IL-12)、介白素-13 (IL-13)、介白素-14 (IL-14)、介白素-15 (IL-15)、介白素-18 (IL-18)、介白素-21 (IL-21)、干擾素- α (IFN- α)、干擾素- β (IFN- β)、干擾素- γ (IFN- γ)、粒細胞菌落刺激因子 (G-CSF)、單球菌落刺激因子 (M-CSF)、粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子 (GM-CSF)、幹細胞因子 (SCF)、白血病細胞抑制因子 (LIF)、flt2／flt3 配體 (FL)、腫瘤抑制素 (oncostatin) M (OM)、紅血球生成素 (EPO)、血小板生成素 (TPO) 等。

【0055】 作為上述激素，例如可列舉：抑黑素（Melatonin）、血清素、甲狀腺素、三碘甲狀腺素、腎上腺素（Epinephrine）、去甲腎上腺素（Norepinephrine）、多巴胺（Dopamine）、脂聯素（Adiponectin）、抗苗勒氏管激素（Anti-Müllerian Hormone）、副腎皮質刺激激素、血管緊縮素原（Angiotensinogen）、血管緊縮素（Angiotensin）、抗利尿激素、心房利尿鈉肽（Atrial Natriuretic Peptide）、降血鈣素（Calcitonin）、膽囊收縮素（Cholecystokinin）、釋皮質促素（Corticotropin-releasing hormone）、紅血球生成素（Erythropoietin）、促卵泡激素（Follicle-stimulating hormone）、胃泌素（Gastrin）、胃內激素（ghrelin）、胰高血糖素（Glucagon）、促性腺激素放出激素（Gonadotropin releasing hormone）、生長素釋素（Growth hormone releasing hormone）、人類絨毛性促性腺激素、人類胎盤生乳素（Human placental lactogen）、成長激素、胰島素、如胰島素生長因子、抑制素（Inhibin）、瘦體素、黃體形成激素（Luteinizing hormone）、黑色素細胞促素（Melanocyte-stimulating hormone）、副甲狀腺激素、促甲狀腺激素（Thyroid stimulating hormone）、促甲狀腺素釋素（Thyrotropin releasing hormone）、催產素（Oxytocin）、胰泌素（Secretin）、生長抑素（Somatostatin）、血小板生成素（Thrombopoietin）、泌乳素（Prolactin）、皮質醇（Cortisol）、醛固酮（Aldosterone）、甾酮、去氫表雄固酮（Dehydroepiandrosterone）、雄固烯二酮（Androstenedione）、二氫甾酮、雌二醇（Estradiol）、雌酮（Estrone）、雌三醇（Estriol）、孕酮（Progesterone）、促鈣三醇（Calcitriol）、促鈣二醇（Calcidiol）、攝護腺素、前列腺環素（Prostacyclin）、白三烯（Leukotriene）、凝血脂素（Thromboxane）、泌乳素釋放激素（Prolactin releasing hormone）、脂促素

(Lipotropin)、腦鈉利尿肽 (Brain natriuretic peptide)、神經肽 Y、組織胺、內皮素 (Endothelin)、胰多肽 (Pancreatic polypeptide)、腎素 (Renina)、腦啡肽 (Enkephalin) 等。

【0056】 作為上述增殖因子，例如可列舉：轉化生長因子- α (TGF- α)、轉化生長因子- β (TGF- β)、巨噬細胞炎症蛋白質-1 α (MIP-1 α)、上皮細胞增殖因子 (EGF)、纖維母細胞增殖因子-1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 (FGF-1、2、3、4、5、6、7、8、9)、神經細胞增殖因子 (NGF)、白血病抑制因子 (LIF)、肝細胞增殖因子 (HGF)、血小板源性生長因子 (PDGF)、蛋白酶連結素 (Protease Nexin) I、蛋白酶連接素 II、膽鹼能分化因子 (cholinergic differentiation factor, CDF)、趨化介素、Notch 配體 (Delta 1 等)、Wnt 蛋白、如血管生成素蛋白 2、3、5 或 7 (Angpt2、3、5、7)、如胰島素生長因子 (IGF)、如胰島素生長因子結合蛋白 (IGFBP)、多效生長因子 (Pleiotrophin) 等，但並不限定於該等。

【0057】 藉由基因重組技術人為地對上述細胞介素或增殖因子之胺基酸序列進行改型而成者亦可添加至培養基中。作為其例，可列舉：IL-6 / 可溶性 IL-6 受體複合體或 Hyper IL-6 (IL-6 與可溶性 IL-6 受體之融合蛋白質) 等。

【0058】 作為上述細胞外基質或細胞接著分子，例如可列舉：膠原蛋白 I~XIX、纖維黏連蛋白、玻璃連結蛋白、層黏連蛋白-1~12、巢蛋白 (Nidogen)、腱生蛋白 (Tenascin)、血小板反應蛋白、遺傳性假血友病 (von Willebrand) 因子、骨橋蛋白 (Osteopontin)、血纖維蛋白原、各種彈力蛋白、各種蛋白多糖、各種鈣黏蛋白、各種整合素、橋粒膠蛋白 (Desmocollin)、

橋粒芯蛋白 (Desmoglein)、E-選擇素 (Selectin)、P-選擇素、L-選擇素、免疫球蛋白超家族 (Immunoglobulin superfamily)、聚-D-離胺酸、聚-L-離胺酸、甲殼素、殼聚糖、瓊脂糖凝膠 (Sephrose)、透明質酸、基質凝膠、海藻酸凝膠、各種水凝膠等，亦可為該等之切斷片段等。

【0059】 作為上述抗生素，例如可列舉：磺胺製劑、青黴素、安比西林、苯氧乙基青黴素 (Phenethicillin)、甲氧西林、乙氧萘青黴素、苯唑西林 (oxacillin)、氯唑西林 (Cloxacillin)、雙氯青黴素、氟氯西林 (Flucloxacillin)、阿莫西林、環己西林 (Ciclacillin)、羧苄青黴素、替卡西林 (Ticarcillin)、哌拉西林 (Piperacillin)、阿洛西林 (Azlocillin)、美洛西林 (Mezlocillin)、阿姆地諾西林 (Amdinocillin)、美西林 (Mecillinam)、頭孢菌素及其衍生物、歐索林酸、氨氟沙星 (Amifloxacin)、替馬沙星 (Temafoxacin)、萘啶酮酸 (nalidixic acid)、吡咯酸、吡哌酸 (pipemidic acid)、克拉維酸 (Clavulanic acid)、 β -溴青黴烷酸、 β -氯青黴烷酸、6-乙醯亞甲基青黴烷酸、賽普沙辛 (Ciprofloxacin)、西諾沙星 (Cinoxacin)、諾氟沙星、培氟沙星 (Perfloxacin)、Rosaxacin、氧氟沙星、依諾沙星 (Enoxacin)、舒巴坦 (Sulbactam)、頭孢呋喃 (Cefoxazole)、Sultampicillin、Adinocillin 及舒巴坦之 Formaldehyde Hydrate Ester、他唑巴坦 (Tazobactam)、氨曲南 (Aztreonam)、Sulfazethin、Isosulfazethin、Norcardicins、間羧基苯基、苯基乙醯胺磷酸甲酯、氯四環素、氧四環素、四環素、地美環素、多西環素、美他環素、二甲胺四環素等。

【0060】 本發明之凝集體係藉由本發明之培養方法而獲得之細胞之凝集體，其特徵在於具有均勻之凝集直徑。由本發明之凝集體獲得大量細胞，且所獲得之細胞均維持未分化性、分化多能性。就細胞之增殖性及分

化多能性之觀點而言，懸浮培養 48 小時後之所有凝集體之直徑為 20 μm 以上且未達 1 mm 之範圍，較佳為 20~950 μm 之範圍，更佳為 20~750 μm 之範圍，進而較佳為 50~500 μm 之範圍，尤佳為 100~300 μm 之範圍。

【0061】 又，本發明之細胞凝集控制劑之特徵在於含有抑制細胞接著分子之物質。本發明之細胞凝集控制劑較佳為用以藉由細胞之懸浮培養而控制凝集體之粒徑。抑制細胞接著分子之物質並無特別限定，較佳為選自 E-鈣黏蛋白、由 E-鈣黏蛋白之一部分區域所構成之蛋白質、包含 E-鈣黏蛋白之全部或一部分區域之融合蛋白質、E-鈣黏蛋白之中和抗體、與 E-鈣黏蛋白結合之肽、及該等之衍生物中之至少 1 種。

【0062】 本發明之培養方法作為能夠以均勻之品質且大量獲得細胞、尤其是 iPS 細胞或 ES 細胞等多能性幹細胞之幹細胞之培養方法極其有用。又，本發明之培養、細胞之凝集體、細胞凝集控制劑、細胞凝集控制劑、及培養基，於再生醫療或藥物開發領域中極其有用。

實施例

【0063】 以下，藉由實施例更詳細地說明本發明，但本發明並不受該等實施例之任何限制。

【0064】 <多能性幹細胞之準備>

將基質凝膠水溶液（於 DMEM 中以 50 倍稀釋）以 1 mL/well 之量添加至未處理之組織培養（Tissue culture）6 孔培養盤（Iwaki 公司製造），於 37°C 下培養 2 小時。其後，去除塗佈劑，而準備人類 iPS 細胞培養盤。

使用 hiPS 細胞（TkDN4-M，東京大學 STEM CELL Bank）作為多能性幹細胞。於準備有該細胞之上述培養盤中以 100,000~400,000 個/well 之密

度播種細胞，並培養 4 天。培養液使用 mTeSR1（Stem cell technologies 公司製造），並以 2 mL/well 之培養基量進行培養。於此期間，除播種 1 天後，每天進行培養基更換。

細胞之剝離、回收使用作為如胰蛋白酶酵素之 TrypLE select（Lifetechnologies 公司製造）。去除培養液後，以成為 1 mL/well 之方式添加 TrypLE select，並於 37°C 下培養 2~5 分鐘。其後，去除 TrypLE select，以 2 mL/well 添加包含 10 μ M 之作為 ROCK 抑制劑之 Y-27632 之 mTeSR1，利用 1000 μ L 微量移液管進行移液，藉此將細胞剝離。使該回收之細胞懸浮液透過 40 μ m 之細胞過濾器（BD），以單一細胞或微小凝集體之形式回收細胞，而獲得向懸浮懸濁培養導入用之細胞。

【0065】 <E-鈣黏蛋白-Fc 融合蛋白質之表現及精製>

依據 Nagaoka M, Akaike T., ProteinEng. 2003; 16: 243-245.而進行 E-鈣黏蛋白-Fc 融合蛋白質之表現與精製。於本實施例中，將由小鼠之 E-鈣黏蛋白總長（理研 BRC DNA Bank，編號 1184）獲得之細胞外區 cDNA 與導入有變異之 IgG1-Fc 區 cDNA（T252M/T254S）連接，而使 E-cad-Fc 融合蛋白質表現。

【0066】 <細胞之凝集體之直徑之測定>

於下述實施例及比較例中，培養期間中之細胞之凝集體之形態及大小係使用相位差顯微鏡（製品名：DM IRB，LEICA 公司製造）進行觀察及測定。

【0067】 <實施例 1>

[實施例 1-1]

於實施了低細胞接著處理之 12 孔培養盤中添加 mTeSR1 1 mL/ml，向其中同時加入預先準備之 hiPS 細胞 (2×10^5 cells/ml)、及作為抑制 hiPS 細胞之細胞接著分子之物質 E-鈣黏蛋白-Fc ($5 \mu\text{g/ml}$)，並以 90~120 rpm 之速度進行 48 小時迴旋培養。利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行處理後經過 48 小時的時候之凝集體之大小為 300~700 μm 之範圍。繼而進行培養基更換，未添加 E-鈣黏蛋白-Fc，除此以外，於與上述相同條件下培養 3 天而獲得凝集體。該凝集體之大小為 500~1000 μm 之範圍。

【0068】 [實施例 1-2]

於實施例 1-1 中將 E-鈣黏蛋白-Fc 之濃度設為 $10 \mu\text{g/ml}$ ，除此以外，均以與實施例 1 同樣之方式獲得凝集體。利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行處理後經過 48 小時的時候之凝集體之大小為 200~400 μm 之範圍，進行培養基更換，未添加 E-鈣黏蛋白-Fc 而培養 3 天，此時之凝集體之大小為 300~1000 μm 之範圍。

【0069】 [實施例 1-3]

於實施例 1-1 中將 E-鈣黏蛋白-Fc 之濃度設為 $20 \mu\text{g/ml}$ ，除此以外，均以與實施例 1 同樣之方式獲得凝集體。利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行處理後經過 48 小時的時候之凝集體之大小為 100~500 μm 之範圍，進行培養基更換，未添加 E-鈣黏蛋白-Fc 而培養 3 天，此時之凝集體之大小為 300~600 μm 之範圍。

【0070】 [實施例 1-4]

於實施例 1-1 中將 E-鈣黏蛋白-Fc 之濃度設為 $50 \mu\text{g/ml}$ ，除此以外，均以與實施例 1 同樣之方式獲得凝集體。利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行

處理後經過 48 小時的時候之凝集體之大小為 $100\sim 300\ \mu\text{m}$ 之範圍，進行培養基更換，未添加 E-鈣黏蛋白-Fc 而培養 3 天，此時之凝集體之大小為 $300\sim 600\ \mu\text{m}$ 之範圍。

【0071】 [實施例 1-5]

於實施例 1-1 中將 E-鈣黏蛋白-Fc 之濃度設為 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，除此以外，均以與實施例 1 同樣之方式獲得凝集體。利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行處理後經過 48 小時的時候之凝集體之大小為 $150\sim 700\ \mu\text{m}$ 之範圍，進行培養基更換，未添加 E-鈣黏蛋白-Fc 而培養 3 天，此時之凝集體之大小為 $300\sim 1000\ \mu\text{m}$ 之範圍。

【0072】 [比較例 1-1]

於實施例 1-1 中未使用 E-鈣黏蛋白-Fc，除此以外，均以與實施例 1 同樣之方式獲得凝集體。利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行處理後經過 48 小時的時候之凝集體之大小為 $1000\sim 3000\ \mu\text{m}$ 之範圍，且培養 3 天時之凝集體之大小為 $1000\sim 3000\ \mu\text{m}$ 之範圍。

【0073】 <細胞之凝集體之觀察>

於實施例 1-1~1-5 及比較例 1-1 中，使用相位差顯微鏡（製品名：DM IRB，LEICA 公司製造）觀察培養第 2 天（利用 E-鈣黏蛋白-Fc 進行處理 48 小時）之細胞之凝集體之形態。將所獲得之顯微鏡照片示於圖 2(A)~(F)。根據圖 2(A)~(F) 可知，與比較例 1-1（E-鈣黏蛋白-Fc 濃度 = $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）中所獲得之凝集體相比，實施例 1-1~1-5（分別為 E-鈣黏蛋白-Fc 濃度 = 5、10、20、50、 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）中所獲得之凝集體大小得到控制。尤其可知，將 E-鈣黏蛋白-Fc 之濃度設為 $10\sim 50\ \mu\text{g}/\text{ml}$

之範圍者之過度凝集得到抑制，即便為單純之迴旋培養亦可獲得達成均勻之凝集體形成之效果。

【0074】 <葡萄糖消耗量之測定>

於整個培養期間中，於培養基更換時採集培養液 300 μ L，使用酵素電極式生物分析儀（YSI2950）分析葡萄糖濃度，並求出葡萄糖消耗量變化。將其結果示於圖 3。

【0075】 <細胞數之測定>

培養結束後，細胞於使用 TrypLE select 分散為單一細胞後，使用台盼藍（Trypan blue）（Life technologies 公司製造）及嗜伊紅血球計數器（Eosinophil Counter）（TATAI 公司製造）對活細胞數進行計數。將其結果示於圖 4。

【0076】 根據圖 3、4 所示之圖表，可將葡萄糖消耗量設為生存之細胞數之指標。根據圖 3、4 所示之結果可知，與比較例 1-1（E-鈣黏蛋白-Fc 濃度=0 μ g/ml）中所獲得之凝集體相比，實施例 1-1~1-5（分別為 E-鈣黏蛋白-Fc 濃度=5、10、20、50、100 μ g/ml）中所獲得之凝集體之葡萄糖消耗量及細胞數之任一者均發揮出優異之效果。尤其是關於培養第 5 天時之葡萄糖消耗量，實施例 1-1 與比較例 1-1 相比增加至約 2 倍，細胞數增加至 1.5~1.75 倍左右。該傾向於實施例 1-2~1-5 中更強，關於葡萄糖消耗量，於實施例 1-2 及 1-5 中達到 2 倍，於實施例 1-3 及 1-4 中達到 2.5 倍，關於細胞數，約於實施例 1-2 中增加至 1.8 倍，於實施例 1-3 中增加至 2.5 倍，於實施例 1-4 中增加至 3 倍，於實施例 1-5 中增加至 2.3 倍，因此可知可獲得大量多能性幹細胞。又，如圖 2 所示，由於凝集體之直徑被控制得更均勻之實施例 1-2~1-4 為優異之結果，因此

可知，藉由抑制過量之細胞之凝集，更多地形成適當之粒徑之凝集體，可提高增殖效率。由此可知，所獲得之細胞係維持未分化性及分化多能性之幹細胞。通常，若亦考慮細胞凝集體會因營養受質或氧之擴散而存在有可成長之極限之尺寸，則推測凝集體之直徑之控制大大地有助於人類 iPS 細胞之大量培養製程之簡易化。

【0077】 <實施例 2>

[實施例 2-1]

於實施了低細胞接著處理之 12 孔培養盤中添加 mTeSR1 1 mL，於其中同時加入預先準備之 hiPS 細胞（TkDN4-M，東京大學 STEM CELL Bank）（ 5×10^5 cells/ml）、及作為抑制 hiPS 細胞之細胞接著分子之物質重組 E-鈣黏蛋白（LD Biopharma 公司製造之 hRP-0339）（ $10 \mu\text{g/ml}$ ），並以 90 rpm 之速度進行 1 天迴旋培養。

【0078】 [實施例 2-2]

於實施例 2-1 中，將抑制 hiPS 細胞之細胞接著分子之物質變更為 E-鈣黏蛋白之中和抗體（Millipore 公司製造之 E-鈣黏蛋白抗體，MAB3199Z）（ $16 \mu\text{g/ml}$ ），除此以外，均以與實施例 2-1 同樣之方式獲得凝集體。

【0079】 [實施例 2-3]

於實施例 2-1 中，將抑制 hiPS 細胞之細胞接著分子之物質變更為 E-鈣黏蛋白-Fc（ $10 \mu\text{g/ml}$ ），除此以外，均以與實施例 2-1 同樣之方式獲得凝集體。

【0080】 [比較例 2-1]

於實施例 2-1 中未使用重組 E-鈣黏蛋白，除此以外，均以與實施例

2-1 同樣之方式獲得凝集體。

【0081】 <細胞之凝集體之觀察>

使用相位差顯微鏡（製品名：DM IRB，LEICA 公司製造）觀察實施例 2-1~2-3 及比較例 2-1 中之細胞之凝集體之形態。將所獲得之顯微鏡照片示於圖 5（A）~（D）。根據圖 5（A）~（D）可知，與比較例 2-1（未添加抑制細胞接著分子之物質）中所獲得之凝集體相比，重組 E-鈣黏蛋白、E-鈣黏蛋白之中和抗體及 E-鈣黏蛋白-Fc 均可將凝集體之直徑調整為均勻。又，E-鈣黏蛋白-Fc 與重組 E-鈣黏蛋白及 E-鈣黏蛋白之中和抗體相比，由於凝集體較大且其形狀較均勻，因此推測與重組 E-鈣黏蛋白及 E-鈣黏蛋白之中和抗體相比，可於 20 μm 以上且未達 1 mm 之範圍內增大 48 小時後之所有凝集體之直徑，可獲得大量細胞。

【0082】 <實施例 3>

[實施例 3-1]

於實施了低細胞接著處理之 12 孔板添加 Essential 8 1 mL，於其中同時添加預先準備之 hiPS 細胞（TkDN4-M，東京大學 STEM CELL Bank）（ 2×10^5 cells/ml）、及作為抑制 hiPS 細胞之細胞接著分子之物質 E-鈣黏蛋白-Fc（50 $\mu\text{g/ml}$ ），並以 100 rpm 之速度進行 5 天迴旋培養。再者，培養第 2 天以後（自培養開始起經過 48 小時後），利用未添加 E-鈣黏蛋白-Fc 之培養基每天進行培養基更換。

【0083】 [實施例 3-2]

於實施例 3-1 中將 E-鈣黏蛋白-Fc 之濃度設為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，除此以外，均以與實施例 3-1 同樣之方式獲得凝集體。

【0084】 [比較例 3-1]

於實施例 3-1 中未使用 E-鈣黏蛋白-Fc，除此以外，均以與實施例 3-1 同樣之方式獲得凝集體。

【0085】 <細胞之凝集體之觀察>

於實施例 3-1、3-2 及比較例 3-1 中，使用相位差顯微鏡（製品名：DM IRB，LEICA 公司製造）觀察培養第 2 天及第 5 天時之細胞之凝集體之形態。將所獲得之顯微鏡照片示於圖 6、7。根據圖 6、7 所示之結果可知，於使用 Essential 8 作為培養基之情形時亦可控制凝集體之大小。於添加 E-鈣黏蛋白-Fc 之情形時，培養第 5 天之凝集體尺寸與培養第 2 天相比有所成長，其直徑被控制為 500 μm 前後。

此處，若考慮使用 mTeSR1 作為培養基之實施例 1-1~1-5（圖 2），則可知於作為培養基使用蛋白質含量較多之 mTeSR1（蛋白質含量約 18 mg/ml）之情形時，與使用蛋白質含量較少之培養基之 Essential 8（蛋白質含量約 9 $\mu\text{g/ml}$ ）之情形時相比，即便抑制細胞接著分子之物質之量較少，亦可獲得同等之效果。推測於使用蛋白質含量較少之培養基之情形時，抑制細胞接著分子之物質於封阻目標之細胞膜鈣黏蛋白之前已吸附於其他細胞膜或培養基材。

【0086】 <葡萄糖消耗量及細胞數之測定>

對實施例 3-1、3-2 及比較例 3-1，與上述相同地測定葡萄糖消耗量及細胞數（圖 8 及圖 9），結果確認到，藉由 E-cad-Fc 之添加，葡萄糖消耗量及細胞數之任一者均亦顯示出優異之效果。

【符號說明】

- 【0087】

- 無

序列表

- 國立大學法人東京大學
- <110> The University of Tokyo
索瑪爾股份有限公司
SOMAR CORPORATION
- <120> 細胞之培養方法、細胞之凝集體、
細胞凝集控制劑、及培養基
- <150> JP 2015-016045
- <151> 2015-01-29
- <160> 30
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 882
- <212> PRT
- <213> 人類
- <400> 1

Met Gly Pro Trp Ser Arg Ser Leu Ser Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gln
1 5 10 15

Val Ser Ser Trp Leu Cys Gln Glu Pro Glu Pro Cys His Pro Gly Phe
20 25 30

Asp Ala Glu Ser Tyr Thr Phe Thr Val Pro Arg Arg His Leu Glu Arg
35 40 45

Gly Arg Val Leu Gly Arg Val Asn Phe Glu Asp Cys Thr Gly Arg Gln
50 55 60

Arg Thr Ala Tyr Phe Ser Leu Asp Thr Arg Phe Lys Val Gly Thr Asp
65 70 75 80

Gly Val Ile Thr Val Lys Arg Pro Leu Arg Phe His Asn Pro Gln Ile
85 90 95

His	Phe	Leu	Val	Tyr	Ala	Trp	Asp	Ser	Thr	Tyr	Arg	Lys	Phe	Ser	Thr
100				105				110							
Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Gly	His	His	His	Arg	Pro	Pro	Pro	His
115				120				125							
Gln	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Gln	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn
130				135				140							
Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Asp	Trp	Val	Ile	Pro	Pro
145				150				155				160			
Ile	Ser	Cys	Pro	Glu	Asn	Glu	Lys	Gly	Pro	Phe	Pro	Lys	Asn	Leu	Val
165				170				175							
Gln	Ile	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Glu	Gly	Lys	Val	Phe	Tyr	Ser	Ile
180				185				190							
Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Thr	Pro	Pro	Val	Gly	Val	Phe	Ile	Ile	Glu
195				200				205							
Arg	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Arg
210				215				220							
Ile	Ala	Thr	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn
225				230				235				240			
Ala	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Glu	Ile	Leu	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Asn
245				250				255							
Asp	Asn	Lys	Pro	Glu	Phe	Thr	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Gly	Ser	Val	Met
260				265				270							
Glu	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Glu	Val	Thr	Ala	Thr	Asp
275				280				285							

Ala	Asp	Asp	Asp	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Thr	Ile
290						295					300				
Leu	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Leu	Pro	Asp	Lys	Asn	Met	Phe	Thr	Ile	Asn
305					310					315					320
Arg	Asn	Thr	Gly	Val	Ile	Ser	Val	Val	Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu
				325					330					335	
Ser	Phe	Pro	Thr	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Gln	Gly
			340					345					350		
Glu	Gly	Leu	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Thr
		355					360						365		
Asn	Asp	Asn	Pro	Pro	Ile	Phe	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Gly	Gln	Val
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Glu	Ala	Asn	Val	Val	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Asp
385					390					395					400
Ala	Asp	Ala	Pro	Asn	Thr	Pro	Ala	Trp	Glu	Ala	Val	Tyr	Thr	Ile	Leu
				405					410					415	
Asn	Asp	Asp	Gly	Gly	Gln	Phe	Val	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Asn	Asn
			420					425					430		
Asp	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	Lys	Gln
		435					440					445			
Gln	Tyr	Ile	Leu	His	Val	Ala	Val	Thr	Asn	Val	Val	Pro	Phe	Glu	Val
	450					455					460				
Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Val	Leu	Asp	Val
465					470					475					480

Asn	Glu	Ala	Pro	Ile	Phe	Val	Pro	Pro	Glu	Lys	Arg	Val	Glu	Val	Ser	
				485					490					495		
Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Gly	Gln	Glu	Ile	Thr	Ser	Tyr	Thr	Ala	Gln	Glu	
			500					505					510			
Pro	Asp	Thr	Phe	Met	Glu	Gln	Lys	Ile	Thr	Tyr	Arg	Ile	Trp	Arg	Asp	
		515					520					525				
Thr	Ala	Asn	Trp	Leu	Glu	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Ile	Ser	Thr	
	530					535					540					
Arg	Ala	Glu	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Phe	Glu	His	Val	Lys	Asn	Ser	Thr	
545					550					555					560	
Tyr	Thr	Ala	Leu	Ile	Ile	Ala	Thr	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	
			565						570					575		
Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Ala	
			580					585					590			
Pro	Ile	Pro	Glu	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Cys	Glu	Arg	Asn	Pro	Lys	
		595					600					605				
Pro	Gln	Val	Ile	Asn	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Thr	Ser	
	610					615					620					
Pro	Phe	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	His	Gly	Ala	Ser	Ala	Asn	Trp	Thr	Ile	
625					630					635					640	
Gln	Tyr	Asn	Asp	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser	Ile	Ile	Leu	Lys	Pro	Lys	Met	
			645						650					655		
Ala	Leu	Glu	Val	Gly	Asp	Tyr	Lys	Ile	Asn	Leu	Lys	Leu	Met	Asp	Asn	
		660						665					670			

Gln	Asn	Lys	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Val	Ser	Val	Cys	Asp	Cys
		675					680					685			
Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Arg	Lys	Ala	Gln	Pro	Val	Glu	Ala	Gly
	690					695					700				
Leu	Gln	Ile	Pro	Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Leu	Ala	Leu
705					710					715					720
Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Arg	Arg	Ala	Val
				725					730					735	
Val	Lys	Glu	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Glu	Asp	Asp	Thr	Arg	Asp	Asn	Val
			740					745					750		
Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gln	Asp	Phe	Asp
		755					760					765			
Leu	Ser	Gln	Leu	His	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Thr	Arg
	770					775					780				
Asn	Asp	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Pro	Arg	Tyr	Leu	Pro	Arg
785					790					795					800
Pro	Ala	Asn	Pro	Asp	Glu	Ile	Gly	Asn	Phe	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Lys
				805					810					815	
Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Val
			820					825					830		
Phe	Asp	Tyr	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu
		835					840					845			
Asn	Ser	Ser	Glu	Ser	Asp	Lys	Asp	Gln	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Asn	Glu
	850					855					860				

Trp Gly Asn Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu
865 870 875 880

Asp Asp

<210> 2
<211> 884
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Met Gly Ala Arg Cys Arg Ser Phe Ser Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gln
1 5 10 15

Val Ser Ser Trp Leu Cys Gln Glu Leu Glu Pro Glu Ser Cys Ser Pro
20 25 30

Gly Phe Ser Ser Glu Val Tyr Thr Phe Pro Val Pro Glu Arg His Leu
35 40 45

Glu Arg Gly His Val Leu Gly Arg Val Arg Phe Glu Gly Cys Thr Gly
50 55 60

Arg Pro Arg Thr Ala Phe Phe Ser Glu Asp Ser Arg Phe Lys Val Ala
65 70 75 80

Thr Asp Gly Thr Ile Thr Val Lys Arg His Leu Lys Leu His Lys Leu
85 90 95

Glu Thr Ser Phe Leu Val Arg Ala Arg Asp Ser Ser His Arg Glu Leu
100 105 110

Ser Thr Lys Val Thr Leu Lys Ser Met Gly His His His His Arg His
115 120 125

His	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser	Glu	Ser	Asn	Pro	Glu	Leu	Leu	Met	Phe	
130						135					140					
Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Asp	Trp	Val	Ile	
145					150					155					160	
Pro	Pro	Ile	Ser	Cys	Pro	Glu	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Pro	Lys	Asn	
				165					170					175		
Leu	Val	Gln	Ile	Lys	Ser	Asn	Arg	Asp	Lys	Glu	Thr	Lys	Val	Phe	Tyr	
			180					185						190		
Ser	Ile	Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Lys	Pro	Pro	Val	Gly	Val	Phe	Ile	
		195					200					205				
Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Lys	Val	Thr	Gln	Pro	Leu	Asp	Arg	
	210					215					220					
Glu	Ala	Ile	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Asn	
225					230					235					240	
Gly	Glu	Ala	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Glu	Ile	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	
				245					250					255		
Gln	Asn	Asp	Asn	Arg	Pro	Glu	Phe	Thr	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Gly	Phe	
			260					265					270			
Val	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Lys	Val	Ser	Ala	
		275					280					285				
Thr	Asp	Ala	Asp	Asp	Asp	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	
	290					295					300					
Thr	Ile	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Leu	Pro	His	Lys	Asn	Met	Phe	Thr	
305					310					315					320	

Val	Asn	Arg	Asp	Thr	Gly	Val	Ile	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Asp
				325				330						335	
Arg	Glu	Ser	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu
			340					345					350		
Gln	Gly	Glu	Gly	Leu	Ser	Thr	Thr	Ala	Lys	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Lys
		355					360					365			
Asp	Ile	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Val	Phe	Asn	Pro	Ser	Thr	Tyr	Gln	Gly
	370					375					380				
Gln	Val	Pro	Glu	Asn	Glu	Val	Asn	Ala	Arg	Ile	Ala	Thr	Leu	Lys	Val
385					390					395					400
Thr	Asp	Asp	Asp	Ala	Pro	Asn	Thr	Pro	Ala	Trp	Lys	Ala	Val	Tyr	Thr
				405					410					415	
Val	Val	Asn	Asp	Pro	Asp	Gln	Gln	Phe	Val	Val	Val	Thr	Asp	Pro	Thr
			420					425					430		
Thr	Asn	Asp	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala
		435					440					445			
Lys	Gln	Gln	Tyr	Ile	Leu	His	Val	Arg	Val	Glu	Asn	Glu	Glu	Pro	Phe
	450					455					460				
Glu	Gly	Ser	Leu	Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Val	Val
465					470					475					480
Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Ile	Phe	Met	Pro	Ala	Glu	Arg	Arg	Val	Glu
				485					490					495	
Val	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Gly	Gln	Glu	Ile	Thr	Ser	Tyr	Thr	Ala
			500					505					510		

Arg Glu Pro Asp Thr Phe Met Asp Gln Lys Ile Thr Tyr Arg Ile Trp
515 520 525

Arg Asp Thr Ala Asn Trp Leu Glu Ile Asn Pro Glu Thr Gly Ala Ile
530 535 540

Phe Thr Arg Ala Glu Met Asp Arg Glu Asp Ala Glu His Val Lys Asn
545 550 555 560

Ser Thr Tyr Val Ala Leu Ile Ile Ala Thr Asp Asp Gly Ser Pro Ile
565 570 575

Ala Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Val Leu Leu Asp Val Asn Asp
580 585 590

Asn Ala Pro Ile Pro Glu Pro Arg Asn Met Gln Phe Cys Gln Arg Asn
595 600 605

Pro Gln Pro His Ile Ile Thr Ile Leu Asp Pro Asp Leu Pro Pro Asn
610 615 620

Thr Ser Pro Phe Thr Ala Glu Leu Thr His Gly Ala Ser Val Asn Trp
625 630 635 640

Thr Ile Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Gln Glu Ser Leu Ile Leu Gln Pro
645 650 655

Arg Lys Asp Leu Glu Ile Gly Glu Tyr Lys Ile His Leu Lys Leu Ala
660 665 670

Asp Asn Gln Asn Lys Asp Gln Val Thr Thr Leu Asp Val His Val Cys
675 680 685

Asp Cys Glu Gly Thr Val Asn Asn Cys Met Lys Ala Gly Ile Val Ala
690 695 700

Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Pro	Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Leu	
705					710					715					720	
Ala	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Arg	Arg	
			725						730					735		
Thr	Val	Val	Lys	Glu	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Asp	Asp	Asp	Thr	Arg	Asp	
			740					745					750			
Asn	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gln	Asp	
		755					760					765				
Phe	Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	
	770					775					780					
Thr	Arg	Asn	Asp	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Pro	Gln	Tyr	Arg	
785					790					795					800	
Pro	Arg	Pro	Ala	Asn	Pro	Asp	Glu	Ile	Gly	Asn	Phe	Ile	Asp	Glu	Asn	
				805					810					815		
Leu	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	
			820						825				830			
Leu	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	
		835					840					845				
Ser	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Ser	Asp	Gln	Asp	Gln	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Leu	
	850					855					860					
Asn	Glu	Trp	Gly	Asn	Arg	Phe	Lys	Lys	Leu	Ala	Asp	Met	Tyr	Gly	Gly	
865					870					875					880	
Gly	Glu	Asp	Asp													

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 3

Ser	Trp	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Pro	Leu	Arg	Ala	Asn	Leu
1				5					10		

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 4

Glu	Trp	Met	Ile	His	Tyr	Asp	Ser	Ala	Leu	Thr	Ser
1				5					10		

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 5

Ala	Trp	Gln	Val	His	Tyr	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Ser
1				5					10		

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 6

Ser	Trp	Leu	Ala	Val	Trp	Pro	Ala	Thr	Gly	Ala	Ser
1				5					10		

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 7

Trp	Thr	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Thr	Cys
1				5				

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 8

Trp	Gln	Phe	Cys	Tyr	Ala	Gln	His	Cys
1				5				

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 9

Trp	Gln	Met	Val	Leu	Cys	Pro	Ala	Cys
1				5				

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 10

Trp Glu Leu Val Gln Cys Leu Thr Cys
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 11

Trp Gln Trp Cys Phe Lys Ala Thr Cys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 12

Trp Thr Phe Asn Phe Cys Thr Ala Cys
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 13

Trp Thr Trp His Trp Pro Pro Cys Cys
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 14

Cys Ser Lys Tyr Asn Ser Pro Leu Cys
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 15

Cys Ser Arg Pro Gln Ser Gly Leu Cys
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 16

Ser Trp Thr Trp His Phe Pro Glu Ser Pro Pro Pro
1 5 10

- <210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 17

Ser Trp Thr Phe Tyr Trp Pro Asp Ala Gln Leu Gly
1 5 10

- <210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 18

Glu Trp Thr Trp Val Phe Pro Thr Thr His Thr Ser
1 5 10

- <210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 19

Glu Trp Asp Phe Phe Trp Pro Pro Thr Gln Thr Pro
1 5 10

- <210> 20
<211> 12

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 20

Glu	Trp	Gln	Tyr	His	Trp	Pro	Thr	Leu	Gln	Ser	Arg
1				5					10		

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 21

Gln	Trp	Gln	Leu	His	Trp	Pro	Ala	Ser	Lys	Gln	Ala
1				5					10		

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 22

Gln	Trp	Thr	Ile	Thr	Tyr	Pro	Lys	Pro	Pro	Ala	Leu
1				5					10		

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 23

Gly	Trp	Thr	Val	Phe	Tyr	Pro	Asp	Asn	Leu	Arg	Pro
1				5					10		

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 24

Gln	Trp	Glu	Trp	His	Tyr	Met	Ala	Gly	Tyr	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 25

Gln	Trp	Glu	Ile	Arg	Tyr	Pro	Trp	Pro	Ser	Met	Gly
1				5					10		

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 26

Gln	Trp	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Leu	Thr	Pro	Arg	Trp
1				5					10		

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 27

Glu	Trp	Thr	Tyr	Thr	Phe	Pro	Thr	Ala	His	Ser	Ile
1				5					10		

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 28

Glu	Trp	Phe	Trp	Ser	Trp	Pro	Gly	Tyr	Ser	Asn	Thr
1				5					10		

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 29

Ser	Trp	Glu	Trp	Ile	Pro	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr
1				5					10	

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 可與 E－鈣黏蛋白結合之肽

<400> 30

Ala	Trp	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Gln	Ser
1				5					10		

申請專利範圍

1. 一種培養方法，其係利用懸浮培養之細胞之培養方法，其特徵在於：
包括下述凝集控制步驟：

將抑制上述細胞之細胞接著分子之物質添加至培養基中，而控制上述細胞之凝集體之直徑；

抑制上述細胞接著分子之物質含有選自重組 E－鈣黏蛋白及 E－鈣黏蛋白－Fc 中之至少 1 種。
2. 如申請專利範圍第 1 項之培養方法，其中，於上述凝集控制步驟中，以含有 10~50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度的方式於上述培養基中添加抑制上述細胞接著分子之物質。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之培養方法，其中，上述細胞為幹細胞或上皮細胞。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之培養方法，其包括於不含抑制上述細胞接著分子之物質之培養基中，對於上述凝集控制步驟中所獲得之細胞之凝集體進行懸浮培養的步驟。
5. 如申請專利範圍第 3 項之培養方法，其包括於不含抑制上述細胞接著分子之物質之培養基中，對於上述凝集控制步驟中所獲得之細胞之凝集體進行懸浮培養的步驟。

圖式

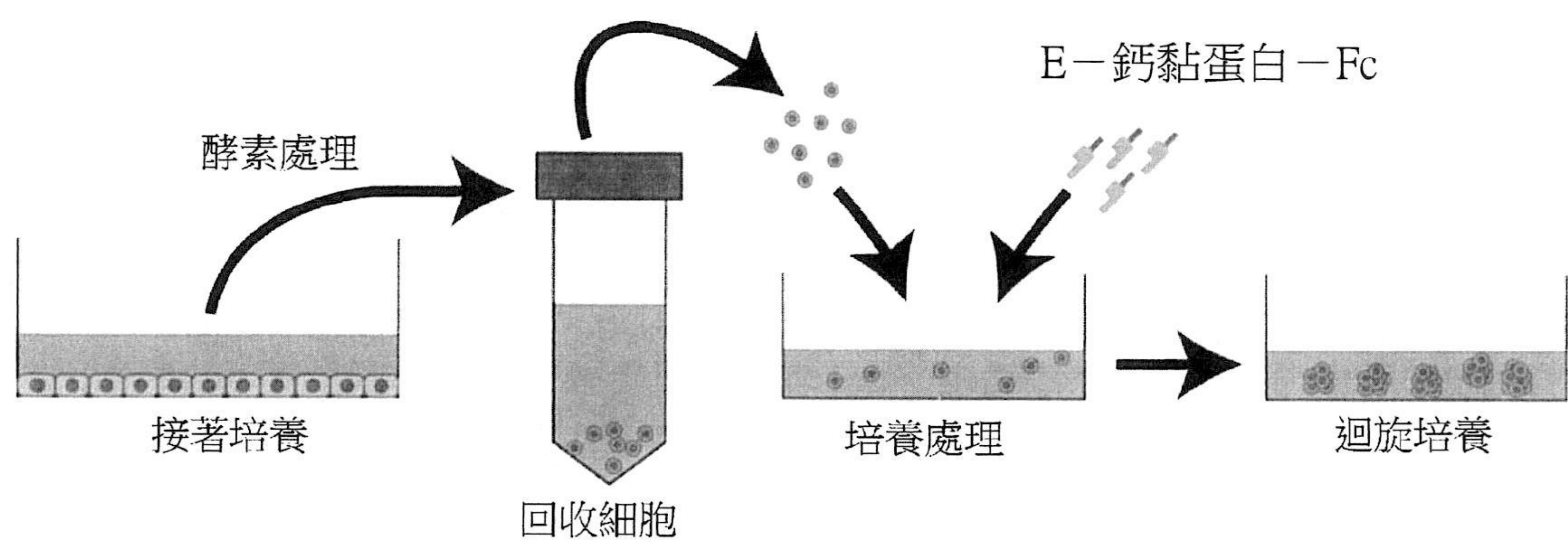


圖1

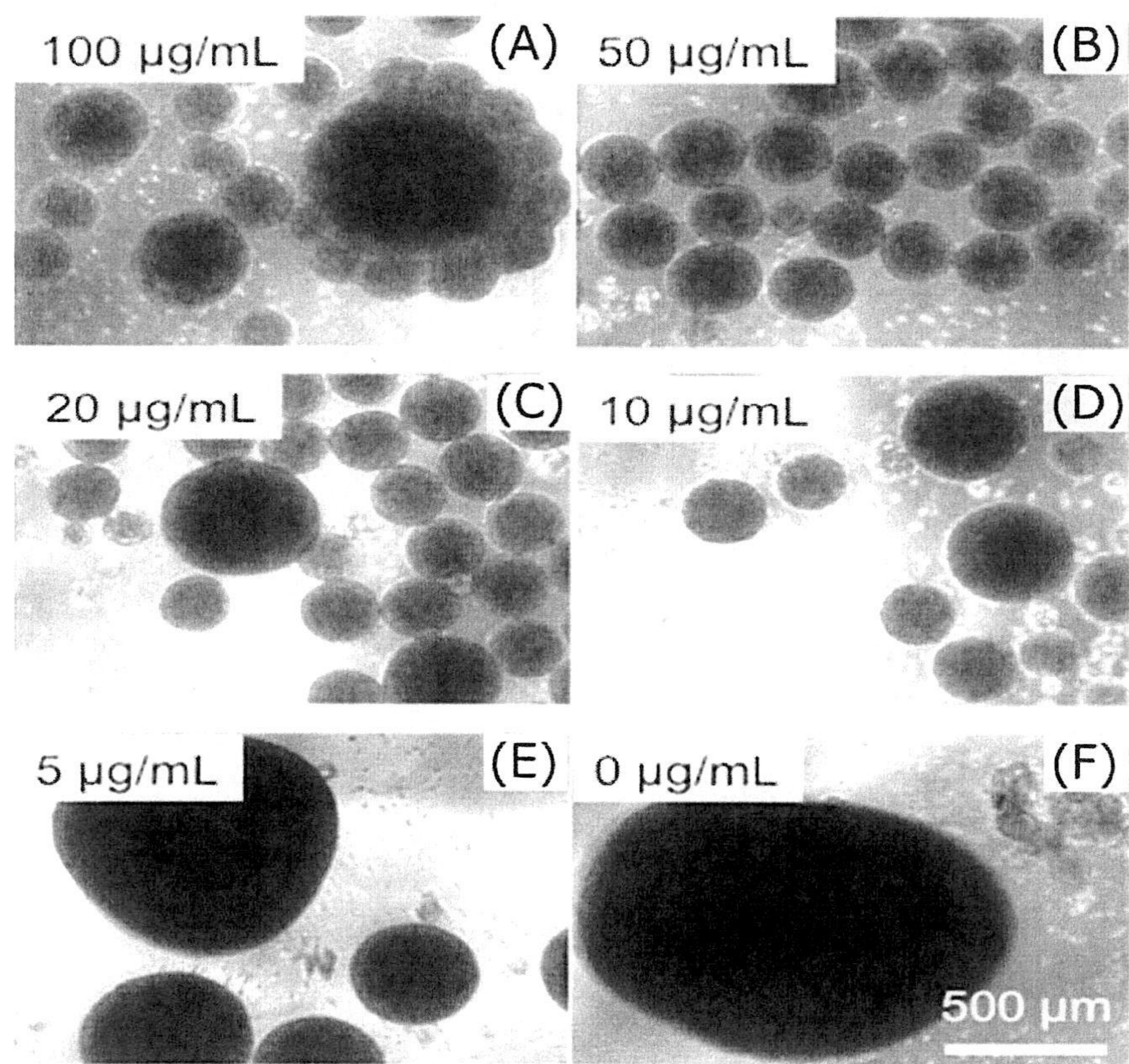


圖2

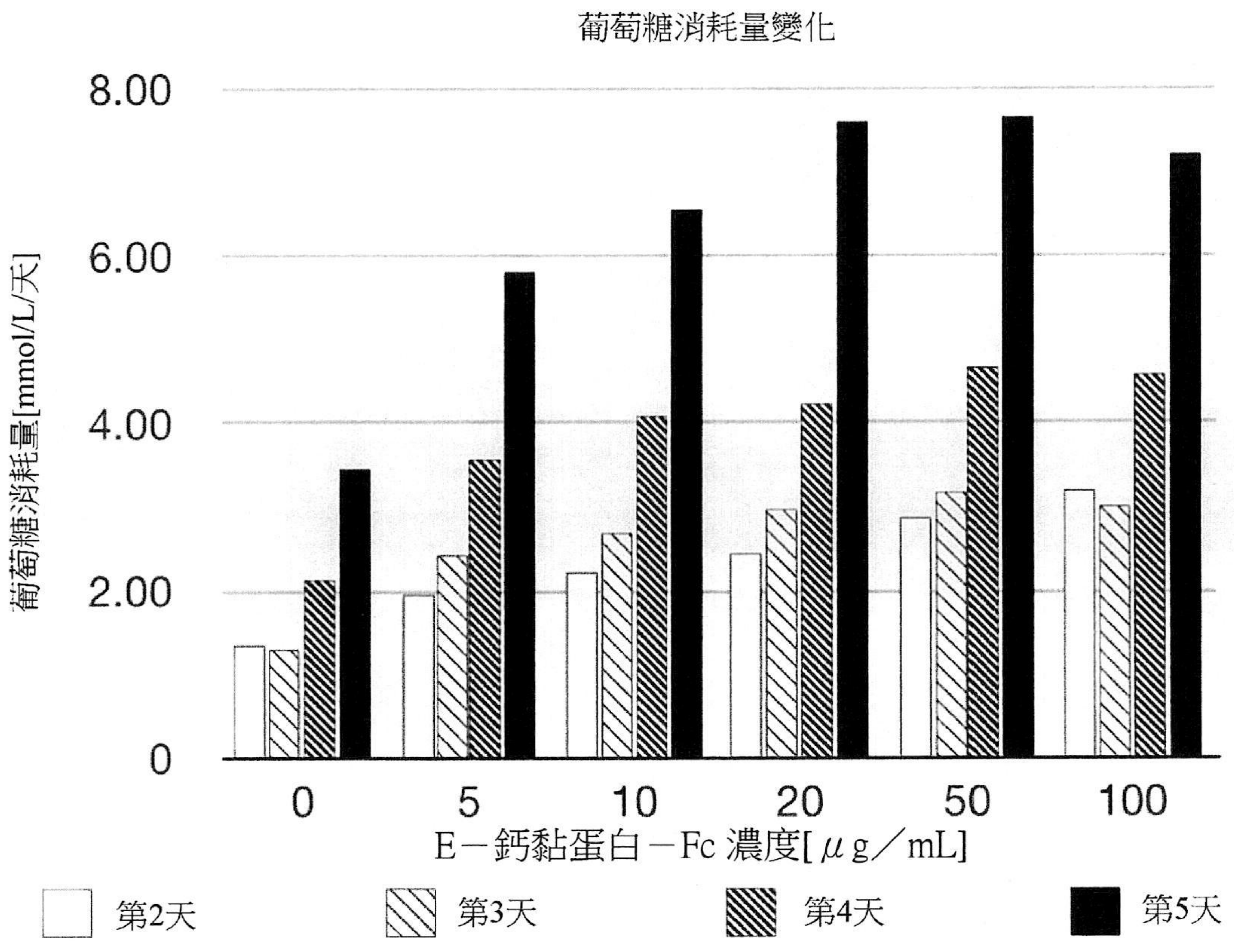


圖3

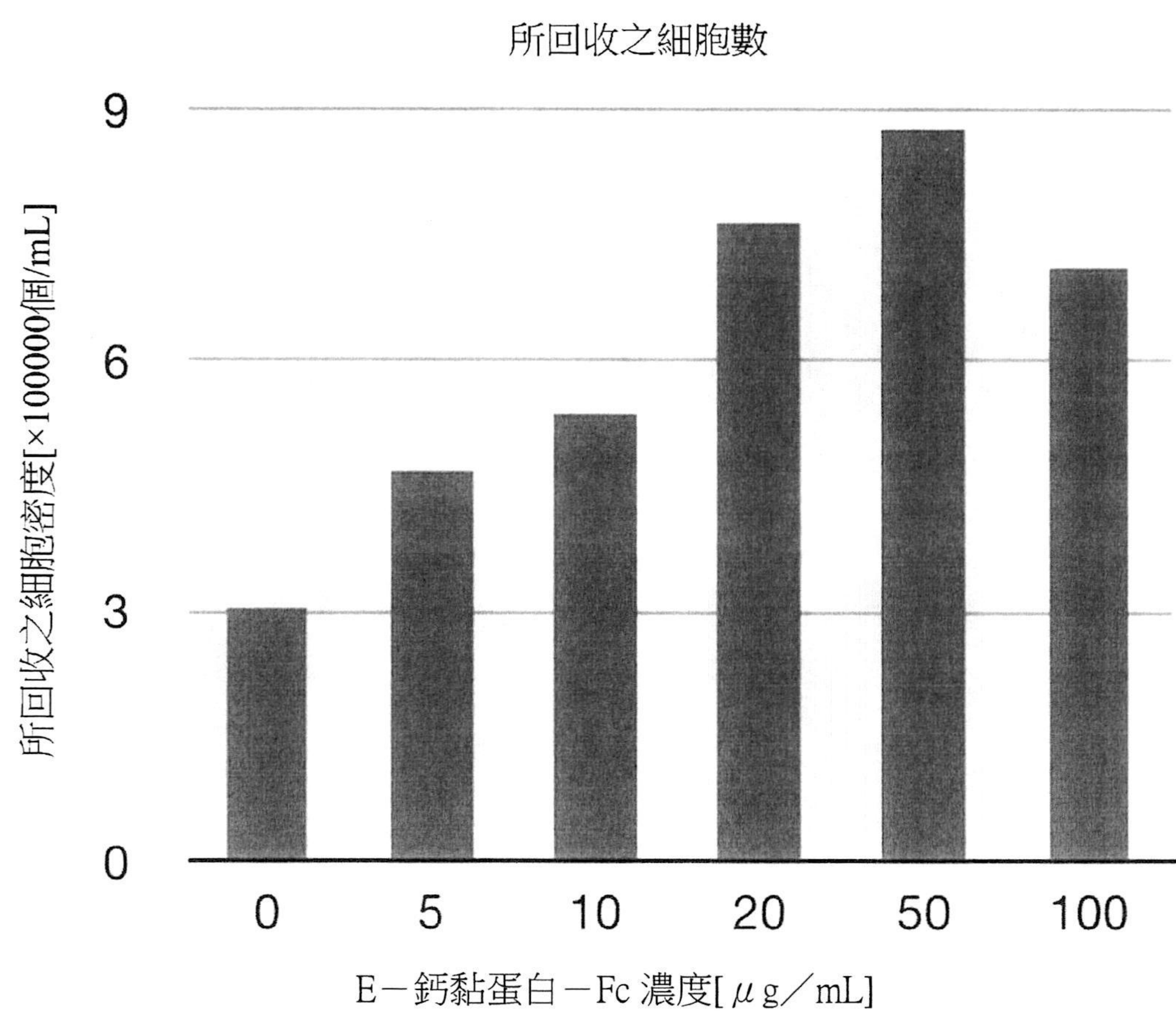


圖4

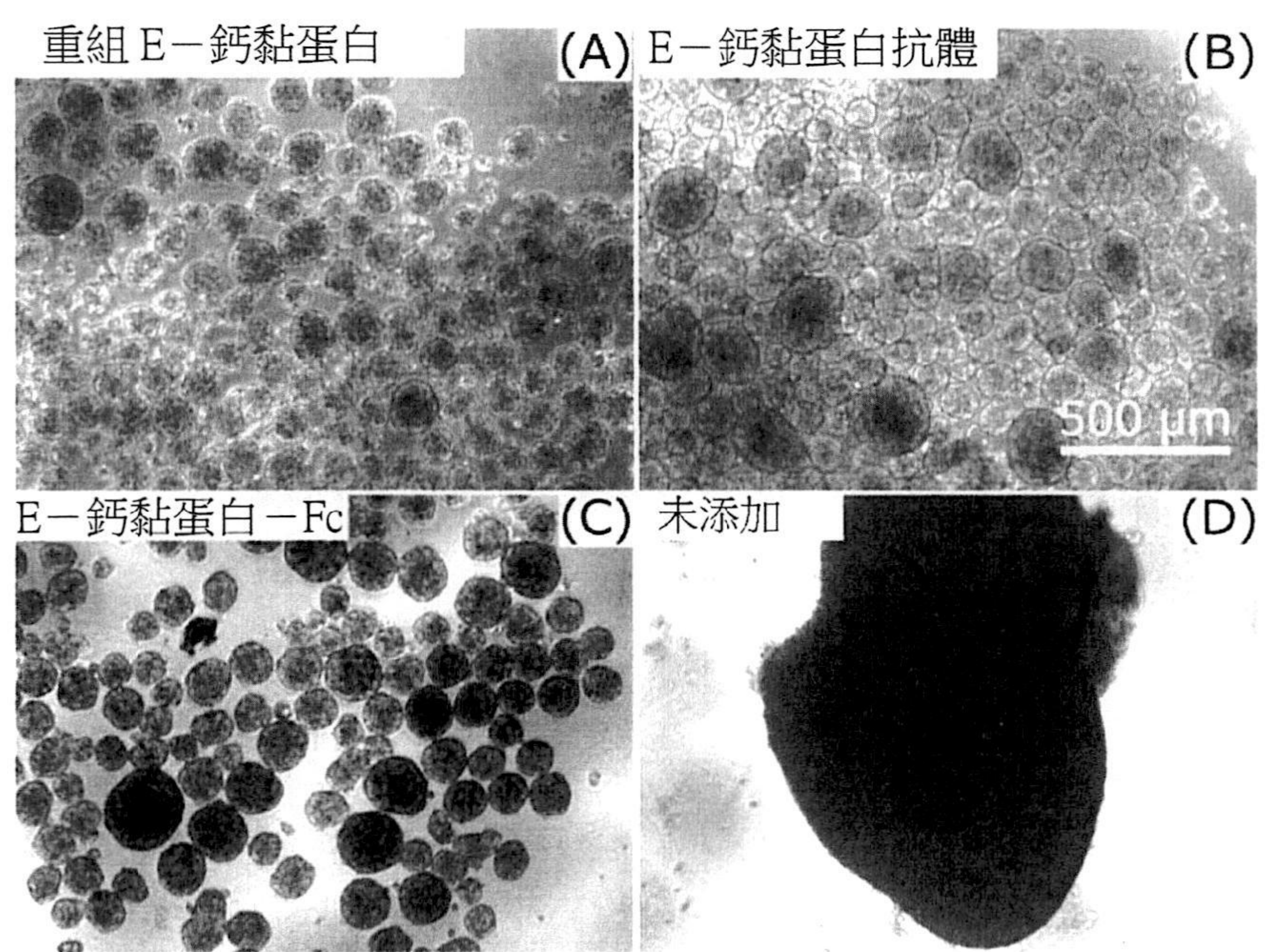


圖5

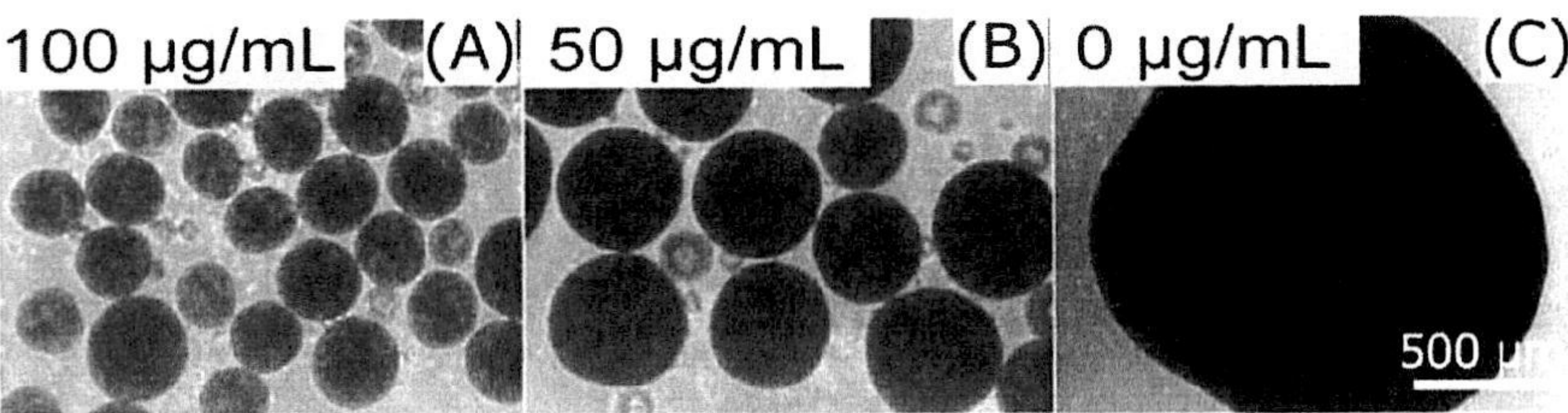


圖6

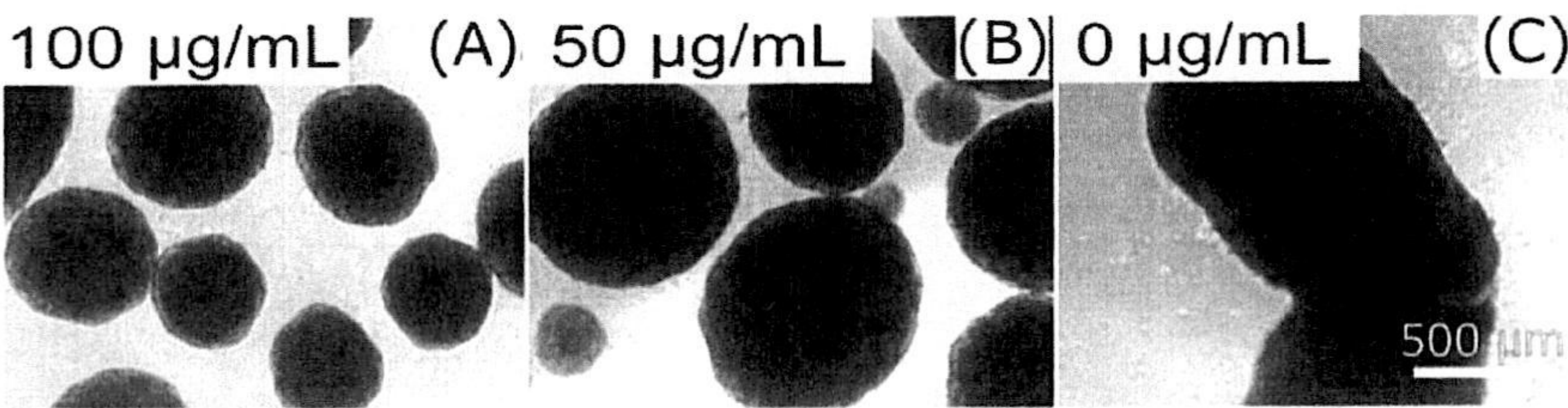


圖7

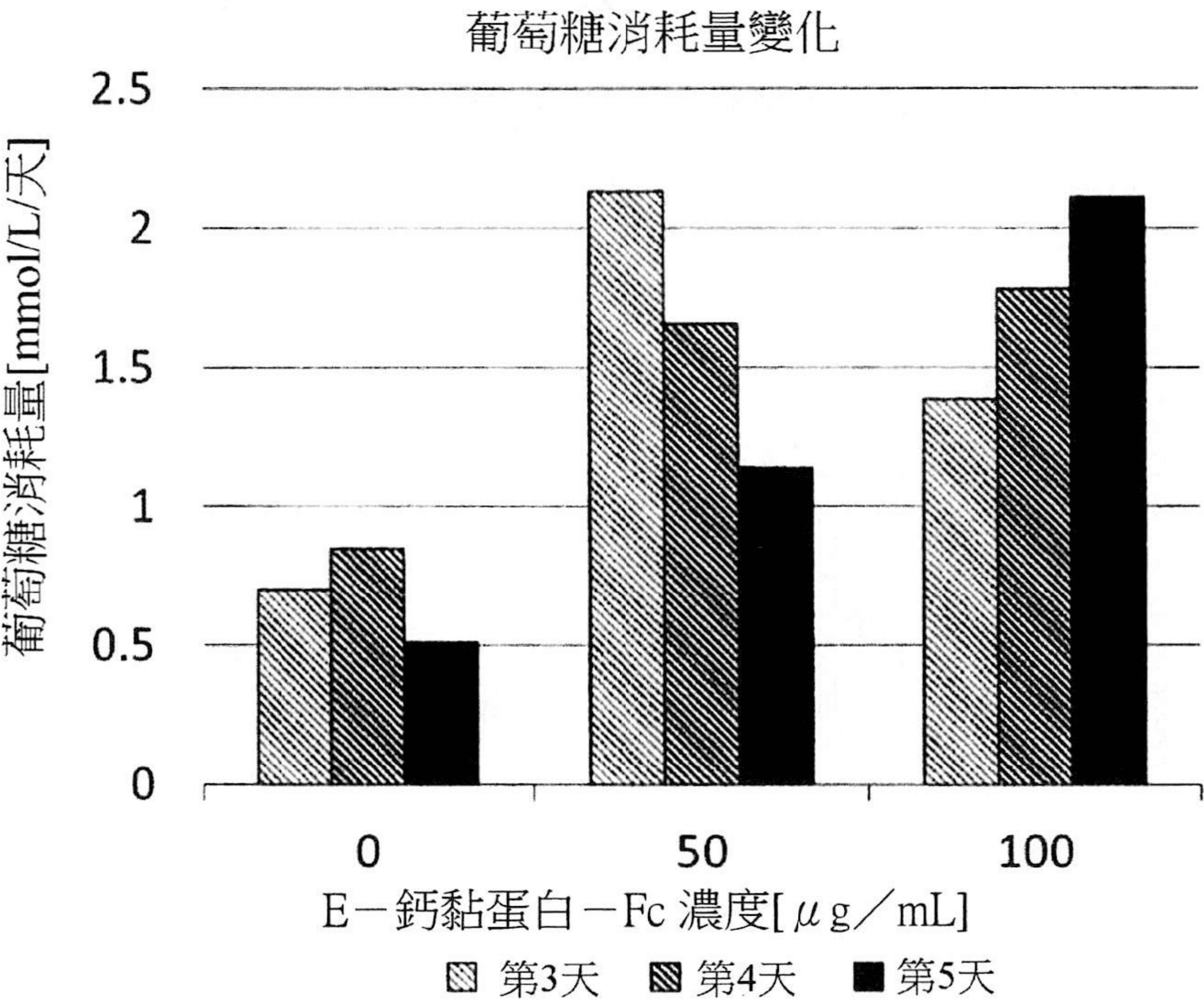


圖8

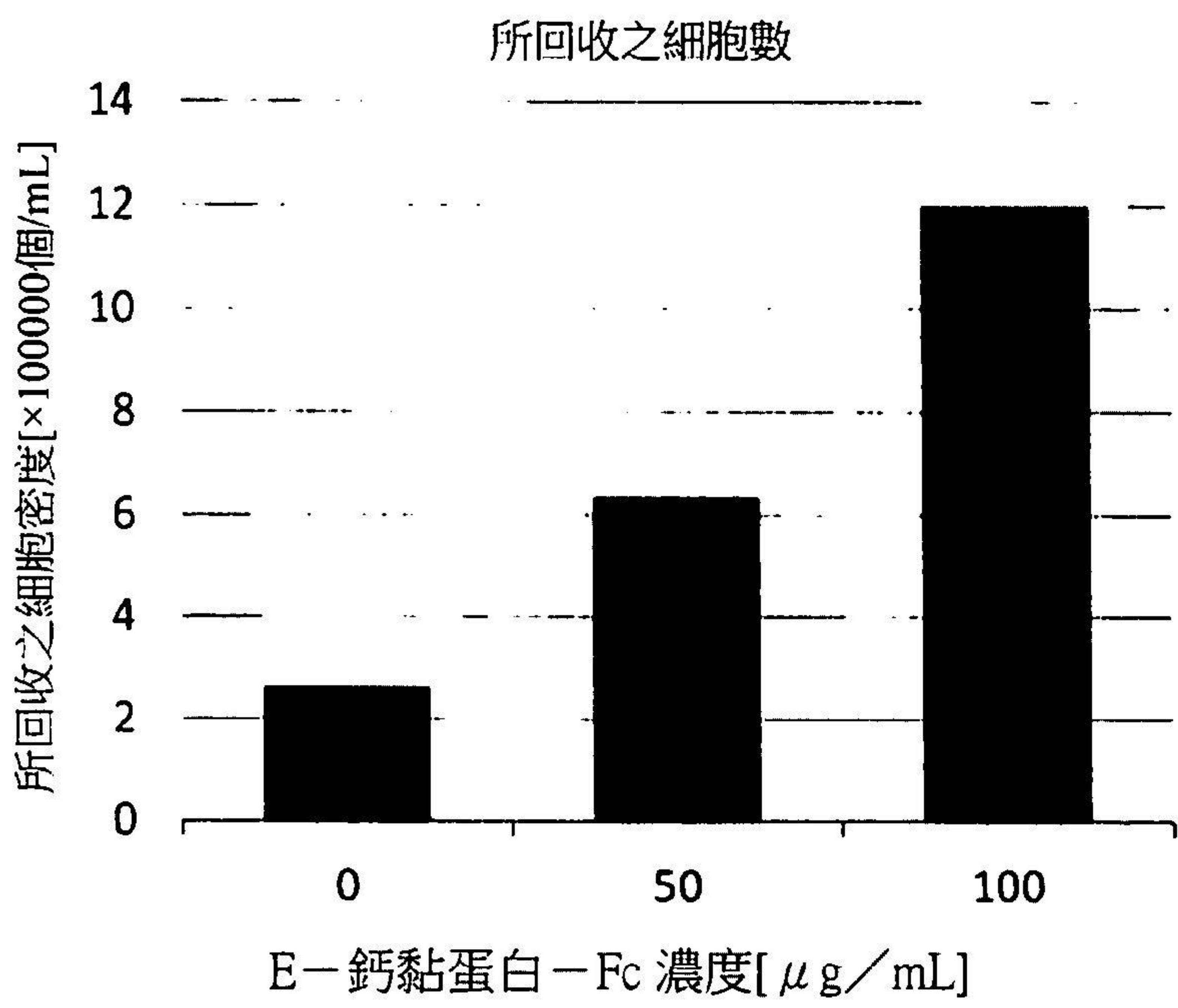


圖9