



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107075475 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580040284.X

(22)申请日 2015.07.16

(30)优先权数据

2014-146283 2014.07.16 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/071048 2015.07.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/010165 JA 2016.01.21

(71)申请人 心脏康复株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 福田惠一 藤田淳 远山周吾

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

C12N 5/077(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页 附图10页

(54)发明名称

新型去除未分化干细胞和纯化精制心肌细胞的培养基

(57)摘要

本发明的课题是找到能够更完全地对非心肌细胞或者未分化干细胞诱导细胞死亡、且能够仅挑选心肌细胞的新的条件。为了解决这样的课题,在本申请中提供用于诱导未分化干细胞的细胞死亡的细胞培养液,其为氨基酸组成中不含谷氨酰胺的物质,并且还提供通过在该细胞培养液中进行培养,从而对非心肌细胞诱导细胞死亡的方法。本申请中进而提供用于选择性地挑选心肌细胞的细胞培养液,其为添加乳酸、丙酮酸或脂肪酸、不含糖类且氨基酸组成中不含谷氨酰胺的物质,并且还提供通过在该细胞培养液中培养心肌细胞与非心肌细胞的混合物,从而选择性地挑选心肌细胞的方法。

1. 一种细胞培养液,其特征在于,氨基酸组成中不含谷氨酰胺。
2. 根据权利要求1所述的细胞培养液,其用于使未分化干细胞产生细胞死亡。
3. 根据权利要求1或2所述的细胞培养液,其特征在于,氨基酸组成中进而不含丝氨酸和甘氨酸。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的细胞培养液,其特征在于,氨基酸组成中进而不含精氨酸。
5. 根据权利要求4所述的细胞培养液,其中,未分化干细胞为具有多能性的干细胞或具有多种分化潜能的干细胞。
6. 一种对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法,其通过在氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液中进行细胞培养来进行。
7. 根据权利要求6所述的对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法,其中,未分化干细胞为具有多能性的干细胞或具有多种分化潜能的干细胞。
8. 根据权利要求6或7所述的对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法,其中,细胞培养液的氨基酸组成中进而不含丝氨酸和甘氨酸。
9. 根据权利要求6~8中任一项所述的对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法,其中,细胞培养液的氨基酸组成中进而不含精氨酸。
10. 根据权利要求6~9中任一项所述的对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法,其中,在不含所述特定的氨基酸的条件下,持续细胞培养12小时~360小时。
11. 一种细胞培养液,其特征在于,其中添加乳酸、不含糖类且氨基酸组成中不含谷氨酰胺。
12. 一种细胞培养液,其特征在于,其中添加丙酮酸、不含糖类且氨基酸组成中不含谷氨酰胺。
13. 一种细胞培养液,其特征在于,其中添加脂肪酸、不含糖类且氨基酸组成中不含谷氨酰胺。
14. 根据权利要求11~13中任一项所述的细胞培养液,其特征在于,氨基酸组成中进而不含丝氨酸和甘氨酸。
15. 根据权利要求11~14中任一项所述的细胞培养液,其特征在于,氨基酸组成中进而不含精氨酸。
16. 根据权利要求11~15中任一项所述的细胞培养液,其用于从心肌细胞与非心肌细胞的混合物中选择性地挑选心肌细胞。
17. 根据权利要求16所述的细胞培养液,其中,非心肌细胞是包括未分化干细胞、除了心肌细胞以外的分化细胞和建株细胞的细胞。
18. 根据权利要求11~17中任一项所述的细胞培养液,其中,添加了所述抗坏血酸或白蛋白。
19. 一种选择性地挑选心肌细胞的方法,其包括在细胞培养液中对心肌细胞与非心肌细胞的混合物进行培养,其特征在于,所述细胞培养液中添加乳酸、不含糖类且氨基酸组成中不含谷氨酰胺。
20. 一种选择性地挑选心肌细胞的方法,其包括在细胞培养液中对心肌细胞与非心肌细胞的混合物进行培养,其特征在于,所述细胞培养液中添加丙酮酸、不含糖类且氨基酸组

成中不含谷氨酰胺。

21. 一种选择性地挑选心肌细胞的方法,其包括在细胞培养液中对心肌细胞与非心肌细胞的混合物进行培养,其特征在于,所述细胞培养液中添加脂肪酸、不含糖类且氨基酸组成中不含谷氨酰胺。

22. 根据权利要求19~21中任一项所述的选择性地挑选心肌细胞的方法,其中,非心肌细胞是未分化干细胞、非心肌的分化细胞或建株细胞。

23. 根据权利要求19~22中任一项所述的选择性地挑选心肌细胞的方法,其中,细胞培养液的氨基酸组成中进而不含丝氨酸和甘氨酸。

24. 根据权利要求19~23中任一项所述的选择性地挑选心肌细胞的方法,其中,细胞培养液的氨基酸组成中进而不含精氨酸。

25. 根据权利要求19~24中任一项所述的选择性地挑选心肌细胞的方法,其中,在不含所述特定的氨基酸的条件下,持续细胞培养12小时~360小时。

26. 根据权利要求19~25中任一项所述的选择性地挑选心肌细胞的方法,其中,添加了所述抗坏血酸或白蛋白。

新型去除未分化干细胞和纯化精制心肌细胞的培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及提供能够用于除去未分化干细胞和纯化精制心肌细胞的培养基。

背景技术

[0002] 由于成人人体中的心肌细胞失去了增殖活性,因而在严重的心肌梗塞、心肌病等疾病时不得不持续一直以来依赖于心脏移植的状况。然而,近年来,对于胚胎干细胞(ESCs)、诱导多能性干细胞(iPSCs)等具有多能性的干细胞的研究得以发展,由此而能够对这些具有多能性的干细胞进行分化/诱导来制作心肌细胞,将这样进行了诱导的心肌细胞用于移植医疗。

[0003] 然而,非生理的条件(即,in vitro条件(体外条件))下的心肌细胞的分化方式与生理发育相同,首先形成未分化的中胚层细胞,其中一部分经过预定(presumptive)心肌细胞(前心脏中胚层)后分化为心肌细胞,但是具有多能性的干细胞基本上可以分化为构成脏器的所有细胞,因此在技术上难以仅通过分化/诱导的操作使其仅分化为心肌细胞这一种细胞。另外,在非生理的条件(in vitro条件)下,有时难以引起对所有具有多能性的干细胞的目标分化,而在诱导后也残留一部分未分化干细胞。

[0004] 由此,在体外将干细胞诱导分化为心肌细胞时,具有多能性的所有干细胞会残留使心肌细胞以外的细胞作为副产物产生、使未分化干细胞残留这样的对包括移植在内的临床应用不利的性质。特别是,残留的未分化干细胞具有增殖活性且能分化为多种细胞,因此,如果在治疗时移植至生物体内的细胞中残留有未分化干细胞,则由该未分化干细胞形成畸胎瘤的危险性极高(非专利文献1(Miura,et al.,Nature Biotech.,743-745,2009))。出于这样的原因,难以将通过诱导多能性干细胞的分化而制作的含有心肌细胞的细胞团直接移植至生物体内并用于治疗。因此,为了安全地使用源自多能性干细胞的心肌细胞进行治疗并得到理想的治疗效果,有必要找到完全排除未分化的多能性干细胞且对心肌细胞进行高度精制的方法(即,除去除了心肌细胞以外的细胞的方法)。

[0005] 迄今为止,已经报告了在培养条件中选择性地除去未分化干细胞的方法(非专利文献2(Ben-David,et al.,Cell Stem Cell,2013 12,pp.167-179)、非专利文献3(Wang,et al.,Science,325,435-439,2009))、非专利文献4(Shiraki,et al.,Cell Metabolism,2014,19,1-15)。在非专利文献2中,发现油酸对于人的未分化多能性干细胞的维持是重要的,证实了:可以通过相反地利用该条件,抑制在人的未分化多能性干细胞内的油酸的生物合成,从而选择性地除去人的未分化多能性干细胞。另外,在非专利文献3中,证实了即使小鼠的胚胎干细胞(胚胎干细胞)能够在排除了除了苏氨酸以外的其它氨基酸的培养液中形成集落,但也无法在排除了苏氨酸的培养液中形成集落,并且证实了通过在除去了苏氨酸的培养液中进行培养,从而能够选择性地除去小鼠的未分化胚胎干细胞。在非专利文献4中,证实了:对于人多能性干细胞,蛋氨酸起到小鼠胚胎干细胞中的苏氨酸的作用,在除去了蛋氨酸的培养液中未分化干细胞死亡或者分化,因此能够选择性地除去人未分化干细胞。

[0006] 然而,在这些文献已证实的方法中,虽然能够除去未分化多能性干细胞,但是却不能除去已经诱导了的除了心肌细胞以外的分化的非心肌细胞。进而,在非专利文献3和非专利文献4中,由于在合成蛋白时除去了非常重要的必需氨基酸,因此也担心对残存的目标细胞的影响。

[0007] 因此,本发明的发明人的研究小组并非着眼于在合成蛋白时非常重要的必需氨基酸,而是着眼于能够由其它来源合成/供给的非必需氨基酸,其目的是不仅能够在由具有多能性的干细胞分化/诱导为心肌细胞时有效地除去未被分化/诱导而残留的未分化干细胞,而且也能够有效地除去分化/诱导心肌细胞时作为副产物产生的除了心肌细胞以外的细胞,并进行了如下研究。其中,发现多种心肌细胞所具有而其它细胞不具有的生理特征,利用这些特征,开发了从非心肌细胞、未分化干细胞中仅挑选心肌细胞的方法。

[0008] 专利文献1:基于细胞的相对的线粒体含量和/或细胞的相对的线粒体膜电位,从含有心肌细胞的细胞混合物中不改变心肌细胞的基因地选择心肌细胞的方法;从含有心肌细胞的细胞混合物中不改变心肌细胞的基因地浓缩心肌细胞的方法;不改变心肌细胞的基因地制造心肌细胞的方法;以及对含有心肌细胞的细胞混合物中的心肌细胞比率进行评价的方法(WO2006/022377);

[0009] 专利文献2:通过在低血清条件、低糖条件、低营养条件、低钙条件、弱酸性pH条件、添加乳酸条件、添加天冬氨酸/谷氨酸条件和/或添加丙酮酸条件的培养液中对源自胚胎干细胞的心肌细胞进行培养,从而能够有效且高度地对心肌细胞进行选择/精制(WO2007/088874);

[0010] 专利文献3:一种制作源自多能性干细胞的心肌细胞的细胞团的方法,其特征在于,通过使含有由多能性干细胞分化、诱导的心肌细胞的聚集的细胞团分散而成为单细胞,从而得到精制的源自多能性干细胞的心肌细胞,使用无血清条件下的培养基对该精制的源自多能性干细胞的心肌细胞进行培养,使该细胞聚集。(WO2009/017254);

[0011] 专利文献4:通过对于多能性干细胞、非心肌细胞的培养条件添加没有确认到具有物理毒性、细胞死亡诱导作用的物质,从而非常有效地对除了心肌细胞以外的细胞诱导细胞死亡的方法(WO2010/114136);而且

[0012] 专利文献5:一种测定培养心肌细胞的动作电位的方法,其特征在于,使培养液中的培养心肌细胞接触压敏性荧光色素,在培养液中添加维生素E和/或胆固醇,测定压敏性荧光色素的电压依赖性 or 离子强度变化依赖性的荧光强度变化。(WO2011/052801)。

[0013] 值得注意的是,专利文献2中发现:心肌细胞对于作为细胞培养的条件通常被认为是严酷的条件(如低糖条件、低血清条件、弱酸性pH条件、低钙条件、低营养条件、添加乳酸条件、添加天冬氨酸/谷氨酸条件、添加丙酮酸条件等条件)下的培养的耐性高,除了心肌细胞以外的细胞(即,非心肌细胞、未分化干细胞)会细胞死亡但心肌细胞存活,从而最终能够挑选出心肌细胞。而且,在使用小鼠的具有多能性的干细胞的研究中,特别是在这些条件中使用低糖条件和添加乳酸条件有助于最有效地挑选心肌细胞,因此也研究了是否可以在挑选源自人的具有多能性的干细胞的心肌细胞时也使用低糖条件和添加乳酸条件。

[0014] 然而,在有关源自人的具有多能性的干细胞的心肌细胞的研究中,低糖条件和添加乳酸条件的培养条件下虽然能够进行未分化干细胞的除去和心肌细胞的挑选,但除去未分化干细胞需要花费时间、以及在临床应用中因处理数亿个细胞而使未分化干细胞的混入

概率增高,因此,寻求能够更完全更短时间地除去未分化干细胞的系统。

[0015] 通过基于葡萄糖的分解代谢反应并利用各种机理而生成ATP,细胞获得其存活所需的大部分能量。已知的是:基于葡萄糖的分解代谢反应而生成ATP的路径主要是:将进入细胞内的葡萄糖降解为丙酮酸的过程即糖酵解系统;使用通过丙酮酸的分解而生成的乙酰辅酶A并使循环运转的TCA循环(柠檬酸循环);另外利用糖酵解系统和TCA循环中生成的NADH、NADPH、和FADH₂而生成ATP的电子传递链。

[0016] 通常,细胞以从环境中摄取葡萄糖为前提来获得能量。在获得这样的能量时,基于糖酵解系统被活化且由糖酵解系统降解葡萄糖,从而借助TCA循环(柠檬酸循环)、电子传递链来获得能量。而且,在急速需要能量时,通过最大限度利用糖酵解系统的厌氧呼吸来获得能量,因此丙酮酸的生成超过其消耗,从而导致乳酸发酵路径被活化。相反,使乳酸返回丙酮酸的逆反应相对地未被活化。

[0017] 现有技术文献

[0018] 专利文献

[0019] 专利文献1:W02006/022377

[0020] 专利文献2:W02007/088874

[0021] 专利文献3:W02009/017254

[0022] 专利文献4:W02010/114136

[0023] 专利文献5:W02011/052801

[0024] 非专利文献

[0025] 非专利文献1:Miura et al.,Nature Biotech.,743-745,2009

[0026] 非专利文献2:Ben-David,et al.,Cell Stem Cell,2013 12,pp.167-179

[0027] 非专利文献3:Wang,et al.,Science,325,435-439,2009

[0028] 非专利文献4:Shiraki,et al.,Cell Metabolism,2014,19,1-15

发明内容

[0029] 发明要解决的问题

[0030] 如上所述,对于在专利文献2中列举的低糖条件和添加乳酸条件下的培养,因条件不同而有非常少地存在残存的非心肌细胞或者未分化干细胞的情况,因此,要求找到能够以更短时间除去未分化干细胞,并最终能够更完全地对非心肌细胞或者未分化干细胞诱导细胞死亡,且能够仅挑选心肌细胞的新的条件。

[0031] 用于解决问题的方案

[0032] 为了解决这样的课题,本申请中提供用于使未分化干细胞产生细胞死亡且为氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液;并且还提供通过在该细胞培养液中进行培养,从而对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法。本申请还提供用于选择性地挑选心肌细胞的、添加了脂肪酸、乳酸或丙酮酸、不含糖类、氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液;并且通过在该细胞培养液中对心肌细胞与非心肌细胞的混合物进行培养而选择性地挑选心肌细胞的方法。

[0033] 发明的效果

[0034] 根据本发明的第一实施方式,可以提供用于使未分化干细胞产生细胞死亡的细胞

培养液,仅通过使用该细胞培养液来简单地进行细胞培养,就能够简便地对未分化干细胞诱导细胞死亡。另外,根据本发明的第二实施方式,可以提供用于选择性地挑选心肌细胞的细胞培养液,仅通过使用该细胞培养液来简单地进行细胞培养,就能够简便地对含有人的胚胎干细胞、诱导多能性干细胞的具有多能性的干细胞等未分化干细胞、除了后述的心肌细胞以外的分化细胞、建株细胞(established cells)诱导细胞死亡,最终能够选择性地挑选心肌细胞。

附图说明

[0035] 图1表示对 2.5×10^5 个人胚胎干细胞培养3天时所消耗的培养基中的氨基酸和葡萄糖浓度的变化。使细胞暴露前的第0天的氨基酸和葡萄糖浓度作为100%。

[0036] 图2表示在各种条件(含有/不含葡萄糖、添加/不添加乳酸和不含在图1中消耗多的各种非必需氨基酸的条件)下对人胚胎干细胞进行培养时,对人胚胎干细胞中的碱性磷酸酶(ALP)染色进行观察的结果。

[0037] 图3表示在各种条件(含有/不含葡萄糖、添加/不添加乳酸和不含在图1中消耗多的各种非必需氨基酸的条件)下对人胚胎干细胞进行培养时,对人胚胎干细胞的生死进行观察的结果。

[0038] 图4表示在各种条件(含有/不含葡萄糖、添加/不添加乳酸和不含在图1中消耗多的各种非必需氨基酸的条件)下对人诱导多能性干细胞进行培养时,对人诱导多能性干细胞中的碱性磷酸酶(ALP)染色进行观察的结果。

[0039] 图5表示在不含葡萄糖且不含各种氨基酸的条件下对人胚胎干细胞进行培养时,对人诱导多能性干细胞中的碱性磷酸酶(ALP)染色进行观察的结果。

[0040] 图6表示在各种条件(含有/不含葡萄糖、添加/不添加乳酸和不含在图1中消耗多的各种非必需氨基酸的条件)下对大鼠新生幼崽心肌细胞进行培养时,对新生幼崽心肌细胞的生死进行观察的结果。

[0041] 图7是在添加了乳酸、不含葡萄糖的培养基(Gluc^- , All^+ , Lactate^+)或添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)条件下培养由人诱导多能性干细胞分化诱导而成的细胞团时的照片。

[0042] 图8是表示将图7中得到的细胞团通过0.25%胰蛋白酶EDTA进行分散处理后,在涂覆纤维连接蛋白的培养皿中进行培养,结果仅心肌细胞存活的图。B, α -辅肌动蛋白阳性心肌细胞的大多数为肌钙蛋白I阳性的心肌细胞。C,确认了:在利用添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)进行纯化精制后Tra1-60阳性的未分化干细胞完全没有残留。

[0043] 图9是利用QPCR对心肌分化诱导后或者纯化精制后的残存未分化干细胞进行评价的结果。利用含有谷氨酰胺的添加了乳酸、不含葡萄糖的培养基(Gluc^- , All^+ , Lactate^+)进行纯化精制时,检测出Lin28,但利用添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)进行纯化精制后完全未检测出Lin28。

[0044] 图10表示在不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养条件下的大鼠新生幼崽心肌细胞与人胚胎干细胞中的乳酸代谢的差异。通过在培养基中投入用 ^{13}C 标记的乳酸,对TCA循环和谷氨酸中的代谢产物进行定量,从而能够分析乳酸是如何代谢的。A表示乳酸相关的代谢图谱。

证实了在心肌细胞中TCA循环内的源自乳酸的代谢产物的总量显著多。进而,在心肌细胞中的2-氧代戊二酸和谷氨酸中也检测出显著多的¹³C。这些数据显示出乳酸更有助于心肌细胞中谷氨酸的生物合成。 $*p<0.05$, $**p<0.01$

[0045] 图11是表示通过FACS对人诱导多能性干细胞分化诱导后的细胞群的肌钙蛋白T阳性细胞的比例进行分析的结果的图。

[0046] 图12是在各种条件(不含葡萄糖、含有/不含谷氨酰胺、含有/不含 α -酮戊二酸和添加/不添加丙酮酸的条件下)对人胚胎干细胞进行培养时,对人胚胎干细胞中的碱性磷酸酶(ALP)染色进行观察的结果。

[0047] 图13是对在各种条件(不含葡萄糖、含有/不含谷氨酰胺、添加/不添加丙酮酸、添加/不添加乳酸的条件下)对大鼠新生幼崽心肌细胞进行培养时的对新生幼崽心肌细胞的生死进行观察的结果。

[0048] 图14:图14A表示残存未分化干细胞的检测方法(Tano, et al., PLOS ONE, 2014)的检测精度的结果。图14B是利用图14A的方法对心肌分化诱导后或者纯化精制后的残存未分化干细胞进行评价的结果。利用添加了乳酸且含有谷氨酰胺、但不含葡萄糖的培养基(Gluc^- , Gln^+ , Lac^+)进行纯化精制时,检测出未分化干细胞的检测标记即TRA1-60,但利用添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)进行纯化精制后完全没检测出TRA1-60。

[0049] 图15表示在不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件以及在不含葡萄糖和谷氨酰胺而添加了乳酸条件下对源自人胚胎干细胞的非心肌细胞(增殖型)进行培养时的细胞的生死。

[0050] 图16是表示用在添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lac^+)中添加了抗坏血酸(25mg/L)或白蛋白(0.1%)的培养基对人诱导多能性干细胞进行培养后的细胞群的观察结果的图。

[0051] 图17是表示用在添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lac^+)中添加了抗坏血酸(25mg/L)或白蛋白(0.1%)的培养基对源自人诱导多能性干细胞的非心肌细胞进行培养后的细胞群的观察结果的图。

[0052] 图18是表示用在添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lac^+)中添加了抗坏血酸(25mg/L)或白蛋白(0.1%)的培养基对源自人诱导多能性干细胞的心肌细胞进行培养后的细胞群的观察结果的图。

[0053] 图19是表示用在添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lac^+)中添加了抗坏血酸(25mg/L)或白蛋白(0.1%)的培养基对源自人诱导多能性干细胞的心肌细胞进行培养744小时后的细胞群的观察结果的图。

具体实施方式

[0054] 糖酵解系统是存在于大部分生物中的、葡萄糖在厌氧条件下被降解为丙酮酸或乳酸的代谢途径,是根本性的能量获得系统。在动物体内,首先,葡萄糖被ATP的 γ -磷酸基磷酸化,或利用糖原分解而引发生成葡萄糖6-磷酸的反应,然后,葡萄糖6-磷酸被依次代谢,经过果糖1,6-二磷酸,使磷酸丙糖裂解,生成ATP,从而成为丙酮酸。期间,作为整体每1mol葡萄糖生成2mol ATP,还原2mol的 NAD^+ ,生成2mol的NADH。该代谢路径的最终产物丙酮酸或是变为乳酸而释放至细胞外,或是移至线粒体内成为柠檬酸循环的底物。

[0055] 三羧酸循环(TCA循环或者柠檬酸循环)是用于最终对糖、脂肪酸、多数氨基酸等的碳骨架进行完全氧化的代谢循环,例如在观察糖酵解系统时,由作为糖酵解系统的最终产物的丙酮酸的降解而产生的乙酰辅酶A与草酰乙酸缩合而生成柠檬酸,依次变为(顺式乌头酸)、异柠檬酸后,经历脱羧脱氢而变为2-氧代戊二酸。进而,依次经历脱羧脱氢、CoA的消除、脱氢、水合、脱氢等反应,并经过琥珀酰辅酶A、琥珀酸、富马酸、苹果酸二变为草酰乙酸。通过1次循环,乙酰辅酶A的乙酰基被完全氧化,利用1分子的乙酰辅酶A的降解而导致释放2分子的CO₂、生成3分子的NADH、生成1分子的还原型FAD、而且生成1分子的GTP。

[0056] 然而,TCA循环不仅仅是简单的降解过程,还是糖·氨基酸·脂肪酸各代谢系统之间转换的调节点,作为同化代谢的重要起点。例如,若糖酵解进行到一定程度,则柠檬酸等的浓度升高,使乙酰辅酶A羧化酶活化,TCA循环本身的运转被抑制在一定限度内,乙酰辅酶A转向脂肪酸合成方向。另外,例如由草酰乙酸制作天冬氨酸。由此,TCA循环的中间体因各种有机物的生物合成而被夺取,因此进行1周TCA循环时再生的草酰乙酸的量通常会减少。因此,为了维持TCA循环平稳的运转,就需要另外补给草酰乙酸的系统,这种系统的例子包括例如:丙氨酸和甘氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、还有苏氨酸被降解为丙酮酸的系统;并且由丙酮酸羧化酶降解丙酮酸,从而供给草酰乙酸的系统;利用转氨酶使天冬氨酸进行转氨基作用而生成草酰乙酸的系统;降解苯基丙氨酸和酪氨酸而生成富马酸的系统;使精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、脯氨酸降解为谷氨酸后,通过谷氨酸脱氢酶使谷氨酸氧化而供给2-氧代戊二酸的系统等。

[0057] 关于动物细胞内的能量获得系统,通过上述的糖酵解系统和TCA循环的各种脱氢反应而生成的氢和电子通过NADH、NADPH、FADH₂等电子供体被转运至线粒体中,被传递给位于线粒体内膜的氧化还原系统的一系列氧化还原酶(复合体)、电子传递体(各种细胞色素等),经过由这些物质构成的电子传递链而还原氧而生成水。此时,H⁺借助膜在单方向上被转运,形成H⁺的电化学电位差,利用这种电位差而最终合成ATP等高能磷酸键。

[0058] 本发明的发明人等进行了广泛而深入的研究,其目的在于:由于专利文献2中列举的已知的各种培养条件中存在很少的残存的非心肌细胞或者未分化干细胞,因此能够找到更完全且以更短时间对非心肌细胞或者未分化干细胞诱导细胞死亡,且能够仅挑选心肌细胞的新的条件。

[0059] 首先,通过测定新鲜的培养液与细胞培养后的培养液中的氨基酸浓度,从而调查了人多能性干细胞中消耗活跃的氨基酸。其结果,可知人多能性干细胞中丝氨酸(Ser)的消耗量、谷氨酰胺(Gln)的消耗量、精氨酸(Arg)的消耗量、胱氨酸(Cys2)的消耗量非常多。另外,发现亮氨酸(Leu)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp)的消耗量也较多(图1)。其中,如非专利文献3和非专利文献4那样,在蛋白合成时不含非常重要的必需氨基酸的情况下,由于担心残存的目标细胞的影响,因此着眼于能够由其它来源合成/供给的非必需氨基酸进行了研究。

[0060] 而且,在葡萄糖的存在下,在各种氨基酸条件下对人的胚胎干细胞或者诱导多能性干细胞进行培养,结果发现:无论是否存在葡萄糖(Gluc),通过用不含丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、谷氨酰胺(Gln)或者精氨酸(Arg)的细胞培养液进行培养,人胚胎干细胞或者诱导多能性干细胞的集落数都降低(图2A和图4A)。而且,确认了不含这些氨基酸的培养条件对人胚胎干细胞或者诱导多能性干细胞的集落数的效果,结果也证实了在不含葡萄糖的培养条件下谷氨酰胺(Gln)、丝氨酸(Ser)和甘氨酸(Gly)、精氨酸(Arg)依次具有强有力的效果

(图3B)。

[0061] 基于这些结果,本发明中发现:通过在培养液中的氨基酸组成中不含谷氨酰胺(Gln⁻),从而能够对含有人的胚胎干细胞、诱导多能性干细胞的具有多能性的干细胞等未分化干细胞、后述的除了心肌细胞以外的分化细胞诱导细胞死亡,因而完成了本发明。

[0062] 因此,在本发明的第一实施方式中提供氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液(Gln⁻)的方案。本发明的第一实施方式中的细胞培养液基于前述见解,作为特征也可进而不含丝氨酸和/或甘氨酸(Ser⁻、Gly⁻),另外作为特征也可进而不含精氨酸(Arg⁻)。可以使用具体可列举出:

- [0063] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液(Gln⁻);
- [0064] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺和丝氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Ser⁻);
- [0065] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺和甘氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Gly⁻);
- [0066] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和甘氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Ser⁻、Gly⁻);
- [0067] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺和精氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Arg⁻);
- [0068] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和精氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Ser⁻、Arg⁻);
- [0069] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Gly⁻、Arg⁻);
- [0070] • 氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液(Gln⁻、Ser⁻、Gly⁻、Arg⁻);等。

[0071] 这些氨基酸均是背景技术中所记载的糖代谢和TCA循环具有相关性的氨基酸,谷氨酰胺被降解为谷氨酸后,进而被谷氨酸脱氢酶氧化而变为2-氧代戊二酸,被导入至TCA循环。另外,丝氨酸和甘氨酸被降解为丙酮酸后,被丙酮酸羧化酶降解而变为草酰乙酸,导入TCA循环。

[0072] 本发明的第一实施方式中的上述的本发明的细胞培养液是不含血清、血清代替品的培养液,对于除了谷氨酰胺、丝氨酸和/或甘氨酸或精氨酸等特定的氨基酸的条件以外的条件而言,可以制成与通常的细胞培养液(例如,达尔伯克改良伊格尔培养液(DMEM)、MEM培养液(例如, α -MEM, MEM[Hank' s BSS])、RPMI培养液(例如,RPMI 1640等)、F12培养液、StemPro34、mTeSR1等)相同的组成。

[0073] 基于本发明的发明人等的研究,具有上述那样特殊的氨基酸组成的细胞培养液能够用于使未分化干细胞、后述的除了心肌细胞以外的分化细胞产生细胞死亡。然而,在想要更有效地对这些细胞诱导细胞死亡时,除了上述氨基酸组成的条件之外也可以使用不含糖类的低糖条件(Gluc⁻)。

[0074] 此处,“未分化干细胞”是指本发明技术领域通常使用的具有多能性的干细胞或具有多种分化潜能的干细胞,包括具有与胚胎干细胞、诱导多能性干细胞等胚胎干细胞类似的性状的其它所有具有多能性的干细胞;以及哺乳动物的成体脏器、组织的细胞、骨髓细胞、血液细胞等中所含的具有多种分化潜能的干细胞。在此情况下,与胚胎干细胞类似的性状可以定义为胚胎干细胞所具有的特异性细胞生物学的性质,如所谓胚胎干细胞中具有特异性表面(抗原)标记的存在、胚胎干细胞特异性基因的表达或畸胎瘤(teratoma)形成能力、嵌合小鼠形成能力。在本发明中,未分化干细胞优选为具有多能性的干细胞。

[0075] 这些细胞也可以通过具有OCT3/4、NANOG、TRA1-60、TRA1-81、SSEA-3、SSEA-4等未分化干细胞所具有的特有的细胞标记来进行定义。

[0076] 由具有多能性的干细胞制备心肌细胞时,可以认为是随着向心肌细胞分化的进行,经过未分化中胚层、心脏中胚层(或预定心肌细胞)而分化为心肌细胞。因此,本发明中称为“心肌细胞”时,是指包括已经开始由未分化的干细胞向心肌细胞分化/诱导的所有细胞的概念,包括经过上述的未分化中胚层、心脏中胚层(或预定心肌细胞)的所有心肌细胞。此处,未分化中胚层是指未分化中胚层中确认了特异性Brachyury蛋白表达的细胞。心脏中胚层(或预定心肌细胞)是指被认为是已经确认到Mesp-1等、开始向心脏分化的中胚层中特异性表达的蛋白且在相同细胞中没有确认到Nkx2.5、辅肌动蛋白等心肌细胞特异性蛋白表达,然后不需要进行进一步的诱导就具有仅向心肌细胞分化的能力的细胞。而且,心肌细胞是指在活细胞的情况下进行着自律搏动的细胞,并且也指固定后表达Nkx2.5、GATA4、辅肌动蛋白等标记的细胞。

[0077] 胎儿期时,血中脂肪酸浓度为0.1mM以下、乳酸浓度为5~7mM,心肌细胞将乳酸作为主要的能量源(Tohyama S., et al., Cell Stem Cell., 2013; 12: 127-137)。出生后,血中脂肪酸浓度上升至0.2~0.4mM,而且乳酸浓度降低至0.5mM,心肌细胞将脂肪酸作为主要的能量源Lopaschuk G.D., et al., Am J Physiol., 1991; 261: H1698-1705; Werner J.C., et al., 1987; 22: 552-556; Medina J.M., Biol Neonate., 1985; 48: 237-244; Lopaschuk G.D., et al., J Cardiovasc Pharmacol., 2010; 56: 130-140)。另外,对出生后的心肌细胞施加局部缺血、压力负荷等应激反应刺激时,基因表达模式变为胎儿型的模式,使得它们能够如胎儿期的心肌细胞那样将乳酸用于主要的能量源。“心肌细胞”通常与其它细胞不同,它们具有能够代替葡萄糖将乳酸、丙酮酸和脂肪酸作为能量源利用这种共通的特征。而且,通过利用其它细胞不具有而仅心肌细胞共通具有的这种特征,从而能够利用本发明来精制心肌细胞。因此,用于本发明的“心肌细胞”不限于该细胞的来源、取得方法。例如也包括:对具有多能性的干细胞进行分化/诱导而得到的“心肌细胞”;采自人的胎儿、新生幼崽和成人的“心肌细胞”;采自属于哺乳类的动物的新生幼崽、胎儿和成人的“心肌细胞”;以及使非心肌的分化细胞直接分化(direct reprogramming)而得到的“心肌细胞”等。

[0078] 本发明中,“建株细胞”是指在细胞培养条件下能够进行自我复制的永生化的细胞。

[0079] 本发明中,细胞培养液中“不含”特定的氨基酸(丝氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺或者精氨酸)和/或糖类时,虽然最终期望培养液中完全不含这些特定的氨基酸、糖类,但只要能够实现本发明的目的,不要求从培养液中100%除去,也容许这些氨基酸中的任一者以微量包含在培养液中。可以容许的这些特定的氨基酸或者糖类的量可以基于如下特征来限定,即未分化干细胞、非心肌细胞、建株细胞等不能增殖地诱导细胞死亡的培养条件。例如,使用将通常细胞培养中使用的市售的培养液中所含的各自的氨基酸量或糖类的量设为低于10%、优选为低于5%、更优选为低于1%的细胞培养液。例如,

[0080] • 达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM、Sigma-Aldrich)是含有L-丝氨酸0.042g/L、甘氨酸0.03g/L、L-谷氨酰胺0.584g/L、L-精氨酸/HCl 0.84g/L或0.084g/L、以及糖类(D-葡萄糖)4.5~10g/L的培养液;

[0081] • F-12培养基(Sigma-Aldrich)是含有L-丝氨酸0.02102或0.0105g/L、甘氨酸0.015014g/L或0.00751g/L、L-谷氨酰胺0.1460~2922g/L、L-精氨酸/HCl 0.4214或0.211g/L、以及糖类(D-葡萄糖)1.26~1.802g/L的培养液;

[0082] • RPMI 1640培养基 (Sigma-Aldrich) 是含有L-丝氨酸0.03~0.3g/L、甘氨酸0.01~0.1g/L、L-谷氨酰胺0.3g/L、L-精氨酸0.2~2g/L、以及糖类 (D-葡萄糖) 2.0~20.0g/L的培养液;

[0083] 因此,称为“不含”特定的氨基酸和/或糖类时,是基于上述的细胞培养中通常使用的培养液的组成,将这些氨基酸量或糖类的量设为低于10%、优选为低于5%、更优选为低于1%。需要说明的是,此处,糖类的情况是指包括培养液中的所有糖类(即,多糖、单糖(葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖等)的概念。

[0084] 基于上述的本发明的第一实施方式,本发明的发明人等通过在氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液中进行培养;或者通过在氨基酸组成中除了不含谷氨酰胺之外还不含丝氨酸和甘氨酸的细胞培养液中进行培养;或者通过在氨基酸组成中进而不含精氨酸的细胞培养液中进行培养,从而能够对未分化干细胞诱导细胞死亡,因此,其结果是可以提供用于对未分化干细胞诱导细胞死亡的方法。

[0085] 在本发明的第一实施方式中,为了诱导未分化干细胞的细胞死亡,而在不含上述特定的氨基酸的条件下,持续进行12小时~360小时细胞培养、优选为24~240小时、更优选为48~120小时。

[0086] 如上所述,将专利文献2中列举的各种心肌细胞培养条件应用于人的细胞时,因条件不同而有非常少地存在残存的非心肌细胞或者未分化干细胞的情况,因此本发明的发明人等通过将专利文献2中证实的用于选择性获得心肌细胞的培养条件的见解与本发明的第一实施方式中得到的有关诱导未分化干细胞的细胞死亡的培养条件的见解相结合,从而研究了是否能够更有效地获得心肌细胞。

[0087] 其结果发现,通过从专利文献2中列举的各种培养时的条件中将低糖条件、添加了能够作为心肌细胞的能量源的乳酸、丙酮酸或脂肪酸的条件的培养条件、与本发明说明书中已证实的如上述那样诱导未分化干细胞的细胞死亡的培养条件相结合,从而能够更有效地获得心肌细胞。

[0088] 基于这些结果,本发明中发现,能够通过作为培养液的条件在添加了乳酸、丙酮酸或脂肪酸的不含糖类的条件下,培养液中的氨基酸组成中不含谷氨酰胺(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻或Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻),从而能够对包含人的胚胎干细胞、诱导多能性干细胞的具有多能性的干细胞等未分化干细胞、除了心肌细胞以外的分化细胞诱导细胞死亡(图2B、图3B和图4B),作为结果能够选择性地仅获得心肌细胞,因而完成了本发明。

[0089] 需要说明的是,考虑到Cys2和Met的消耗量较多,使用在添加了乳酸、不含糖类的条件下(Lactate⁺、Gluc⁻)、不含这些氨基酸中任一者的培养基,研究了未分化干细胞(人胚胎干细胞)是否死亡。其结果证实了,与添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻)的情况相比,添加了乳酸、不含葡萄糖和Cys2的培养基(Lactate⁺、Gluc⁻、Cys2⁻)和添加了乳酸、不含葡萄糖和Met的培养基(Lactate⁺、Gluc⁻、Met⁻)的细胞死亡诱导活性仅仅具有与作为对照使用的添加了乳酸、不含葡萄糖和苏氨酸的培养基(Lactate⁺、Gluc⁻、Thr⁻)同等程度的细胞死亡诱导活性,证实了添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻)的细胞死亡诱导活性最为显著(图5)。该结果启示出:与非专利文献3和非专利文献4所示的未分化干细胞中的苏氨酸、蛋氨酸相比,不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基在除去残存的未分化干细胞的能力方面更优异。

[0090] 因此,在本发明的第二实施方式中提供细胞培养液,其特征在于,添加了乳酸、丙酮酸或脂肪酸、(Lactate⁺或Pyr⁺)、不含葡萄糖(Gluc⁻)、氨基酸组成中不含谷氨酰胺(Gln⁻)。本发明的第二实施方式中的细胞培养液,作为特征也可进而不含丝氨酸和/或甘氨酸(Ser⁻;Gly⁻),另外,作为特征也可进而不含精氨酸(Arg⁻)。可以使用具体可列举出:

[0091] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻);

[0092] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和丝氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻);

[0093] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和甘氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Gly⁻);

[0094] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和甘氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻、Gly⁻);

[0095] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和精氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Arg⁻);

[0096] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和精氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻、Arg⁻);

[0097] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Gly⁻、Arg⁻);

[0098] • 添加乳酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液(Lactate⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻、Gly⁻、Arg⁻);

[0099] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻);

[0100] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和丝氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻);

[0101] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和甘氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Gly⁻);

[0102] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和甘氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻、Gly⁻);

[0103] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和精氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Arg⁻);

[0104] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和精氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻、Arg⁻);

[0105] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Gly⁻、Arg⁻);

[0106] • 添加丙酮酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液(Pyr⁺、Gluc⁻、Gln⁻、Ser⁻、Gly⁻、Arg⁻);

[0107] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液;

[0108] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和丝氨酸的细胞培养液;

[0109] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和甘氨酸的细胞培养液;

[0110] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和甘氨酸的细胞培养液；

[0111] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺和精氨酸的细胞培养液；

[0112] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸和精氨酸的细胞培养液；

[0113] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液；

[0114] • 添加脂肪酸、低糖条件、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸和精氨酸的细胞培养液；等。

[0115] 本发明的细胞培养液也可以添加抗坏血酸或白蛋白，或者这两者。即使添加抗坏血酸、白蛋白，也不会对细胞培养液的细胞死亡诱导活性产生影响。

[0116] 本发明的第二实施方式中的上述的细胞培养液是不含血清、血清代替品的培养液，对于除了乳酸、丙酮酸和脂肪酸、葡萄糖、谷氨酰胺、丝氨酸和/或甘氨酸氨基酸或精氨酸等特定的氨基酸的条件以外的条件，可以制成与通常的细胞培养液（例如，达尔伯克改良伊格尔培养液（DMEM）、MEM培养液（例如， α -MEM，MEM[Hank's BSS]）、RPMI培养液（例如，RPMI 1940等）、F12培养液、StemPro34、mTeSR1等）相同的组成。

[0117] 基于本发明的发明人等的研究，虽然具有上述那样特殊的氨基酸组成的细胞培养液诱导未分化干细胞、除了心肌细胞以外的分化细胞、建株细胞的细胞死亡，但不会对心肌细胞诱导细胞死亡。作为其结果，本发明的第二实施方式中的细胞培养液能够用于从心肌细胞与非心肌细胞的混合物中选择性地挑选心肌细胞。

[0118] 本发明中，细胞培养液中添加乳酸的情况，是指对于使用的细胞培养液以成为0.1~10mM的方式添加乳酸（Lactate）。另外，细胞培养液中添加丙酮酸的情况，是指对于使用的细胞培养液以成为0.1~10mM的方式添加丙酮酸（Pyruvic acid）。细胞培养液中添加脂肪酸的情况，是指对于使用的细胞培养液，添加中链脂肪酸（碳数为5~12个的脂肪酸）、长链脂肪酸（碳数多于12个的脂肪酸）。例如可以以成为0.05~0.5mM的方式添加油酸、亚油酸和棕榈酸等。

[0119] 另一方面，对于其它成分而言，细胞培养液中“不含”特定的氨基酸（丝氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺或者精氨酸）和/或糖类时，虽然最终期望培养液中完全不含这些特定的氨基酸、糖类，但只要能够实现本发明的目的，不要求从培养液中100%除去。

[0120] 基于上述的本发明的第二实施方式，本发明的发明人等通过在除了添加乳酸、丙酮酸或脂肪酸、不含葡萄糖以外，氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液中进行培养；或者在氨基酸组成中除了不含谷氨酰胺以外还不含丝氨酸和甘氨酸的细胞培养液中进行培养；或者在氨基酸组成中进而不含精氨酸的细胞培养液中进行培养，从而能够对非心肌细胞诱导细胞死亡，因此，作为结果，通过对心肌细胞与非心肌细胞的混合物进行培养而诱导非心肌细胞的细胞死亡，作为结果可以提供选择性地挑选心肌细胞的方法。在本发明中，非心肌细胞时，包括除了心肌细胞和将来会分化/诱导为心肌细胞的细胞以外的所有细胞，包括例如未分化干细胞、非心肌的分化细胞或建株细胞。

[0121] 在本发明的第二实施方式中，为了诱导未分化干细胞的细胞死亡而在不含上述特定的氨基酸的条件下，持续进行12小时~360小时细胞培养、优选为24~240小时、更优选为

48~120小时。

[0122] 本发明的细胞培养液也可以添加抗坏血酸或白蛋白,或者这两者。即使添加抗坏血酸、白蛋白,也能够不对细胞培养液的细胞死亡诱导活性心肌细胞的精制精度产生影响,从而能够将心肌细胞培养600小时以上。

[0123] 在本说明书的以下内容中示出实施例。这些实施例为了说明本发明,无论什么形式都并非用于限定本发明。

[0124] 实施例

[0125] 实施例1:细胞的培养

[0126] 在本实施例中,进行了未分化干细胞(胚胎干细胞和诱导多能性干细胞)的培养、分化细胞的培养及由未分化干细胞分化为心肌细胞的培养。

[0127] 人胚胎干细胞(hESCs)从国立大学法人·京都大学再生医科学研究所附属干细胞医学研究中心中辻宪夫教授获得,人诱导多能性干细胞从国立大学法人·京都大学iPS细胞研究所山中伸弥教授获得。使用基质胶(Matrigel)(BD Bioscience, Cat No.354277)对该人胚胎干细胞和人诱导多能性干细胞进行了维持未分化的培养。培养液使用mTeSR1(STEMCELL Technologies Inc., Cat No.11875-119)。关于维持未分化的培养液,除了mTeSR1以外还有Essential 8(Life Technologies)、TeSR2(STEMCELL Technologies Inc.)等,作为无饲养层用的培养基只要是通常使用的培养基就可以使用。另外,作为基质,除了基质胶(Matrigel)以外还有Vitronectin(Life Technologies)、iMatrix-511(Takara no.892001)等,作为其它的无饲养层用的基质只要为通常使用的基质就可以使用。

[0128] 传代时,利用CTK溶液(Repro CELL)、于37℃下对人胚胎干细胞和诱导多能性干细胞的集落进行5分钟分离。关于细胞的分散处理,除了CTK溶液以外还可以使用StemPro Accutase(Life Technologies no.1110501)、TrypLE Express/Select(Life Technologies)。

[0129] 关于由未分化干细胞分化/诱导为心肌细胞,在这次实验中使用的的心肌分化诱导法如下:

[0130] • 心肌分化时,在人胚胎干细胞或人诱导多能性干细胞达到50~90%汇合时,用添加有B27(没有胰岛素、Invitrogen)和CHIR99021(Selleckchem or Wako)6μM的RPMI培养基(Invitrogen)更换了培养基(第0天)。

[0131] • 第1天~第2天,用RPMI/B27胰岛素(-)培养基进行了培养。

[0132] • 接着,第3天~第5天,用在RPMI/B27胰岛素(-)培养基中进而添加了IWP25μM或者IWR-1(Sigma I0161)5μM的培养基进行了培养。

[0133] • 进而,第6天~第7天,用RPMI/B27胰岛素(-)培养基进行了培养。

[0134] • 而且,第8天及之后,用RPMI/B27胰岛素(+)培养基进行了培养。(Lian, X., et al., Nat Protocol, 2013, 8, 162-175)。第8天~第11天时,能够确认搏动的心肌细胞。

[0135] 为了设立培养液中尽可能地不含糖的条件,而用PBS清洗2次(Gluc⁻),最终在加入4mM乳酸(Wako Pure Chemical, Cat No.129-02666)的D-MEM培养液(Lactate⁺条件)中,在谷氨酰胺存在下(Gln⁺)或谷氨酰胺非存在下(Gln⁻)进行3~4天培养。乳酸浓度需要调整在1~10mM的范围内。本实施例中添加了4mM的乳酸。

[0136] 实施例2:在培养条件下的培养未分化干细胞的氨基酸需求性

[0137] 在本实施例中,作为未分化干细胞使用人胚胎干细胞或人诱导多能性干细胞,对在培养条件下未分化干细胞需要哪种氨基酸进行了研究。

[0138] 为了研究人胚胎干细胞中消耗特别活跃的非必需氨基酸和半必需氨基酸,测定了培养基中的氨基酸浓度。具体而言,在3.5cm的培养皿中每种细胞以 1.5×10^6 个细胞进行培养,然后分析了细胞培养开始前的培养液组成和细胞培养后的培养液组成。

[0139] 氨基酸分析依据新保等(Shimbo,K.,Rapid Commun.Mass Spectrom.,2009,23,1483-1492)的系统来实施。将细胞培养后的上清移至1.5mL管内,直至测定为止在 -80°C 下保存。对样品实施蛋白除去处理后,用APDS试剂实施衍生化并置于分析装置。使用标准曲线算出各样品中的氨基酸浓度。分析的37种氨基酸如下:甘氨酸(Gly)、肌氨酸(Sar)、丙氨酸(Ala)、 γ -氨基丁酸(GABA)、 β -异氨基丁酸(b-AiBA)、 α -氨基丁酸(α -ABA)、丝氨酸(Ser)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、苏氨酸(Thr)、牛磺酸(Tau)、羟基脯氨酸(HyPro)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、天冬酰胺(Asn)、鸟氨酸(Orn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、赖氨酸(Lys)、谷氨酸(Glu)、蛋氨酸(Met)、组氨酸(His)、 α -氨基己二酸(α -AAA)、羟赖氨酸(HyLys)、苯基丙氨酸(Phe)、1-甲基组氨酸(1MeHis)、3-甲基组氨酸(3MeHis)、精氨酸(Arg)、瓜氨酸(Cit)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、胱硫醚(cysthi)、肌肽(Car)、鹅肌肽(Ans)、胱氨酸(Cys2)、丙氨酸-谷氨酰胺(Ala-Gln)、甘氨酸-谷氨酰胺(Gly-Gln)。

[0140] 对于丝氨酸、精氨酸、胱氨酸、谷氨酰胺,可知特别是根据培养时间而培养基中的浓度显著降低。

[0141] 接着,为了确定在各种条件下进行培养时细胞的存活,通过利用StemTAG™碱性磷酸酶染色试剂盒(Sigma 86-R)来确认显色的细胞为活细胞的方法来测定细胞所具有的碱性磷酸酶(ALP)的活性,在人胚胎干细胞(图2)和人诱导多能性干细胞(图4)中,研究了针对各种氨基酸条件的反应性。

[0142] 以高葡萄糖DMEM(Invitrogen)的组成为基础(图2A和图4A、“Gluc⁺条件”),制作了不含谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸、精氨酸这4种氨基酸的培养基、和DMEM的基本组成中仅不含上述任意1种氨基酸(仅丝氨酸、仅丝氨酸/甘氨酸、仅精氨酸、仅谷氨酰胺)的培养基(分别为“Ser⁻”“Ser⁻Gly⁻”“Arg⁻”“Gln⁻”)。在上述培养条件下对人胚胎干细胞和人诱导多能性干细胞培养约48小时后,进行ALP染色,结果可知:无论是否存在葡萄糖,通过在不含丝氨酸的条件(Ser⁻)、不含丝氨酸/甘氨酸的条件(Ser⁻Gly⁻)、不含谷氨酰胺的条件(Gln⁻)、不含精氨酸的条件(Arg⁻)下进行细胞培养,从而使人胚胎干细胞或者诱导多能性干细胞的集落数降低。然而,即使培养48小时后也能够发现大量ALP阳性的未分化集落(图2A、图4A)。

[0143] 接着,以不含葡萄糖的DMEM(Invitrogen)的组成为基础,制作了添加乳酸(4mM)(图2B和图4B、“Gluc⁻、Lactate⁺条件”)、DMEM的基本组成中不含丝氨酸、甘氨酸、精氨酸、谷氨酰胺这4种氨基酸的培养基、和DMEM的基本组成中仅不含上述任意1种氨基酸(仅丝氨酸、仅丝氨酸/甘氨酸、仅精氨酸、仅谷氨酰胺)的培养基(分别为“Ser⁻”“Ser⁻Gly⁻”“Arg⁻”“Gln⁻”)。在上述培养条件下对人胚胎干细胞和人诱导多能性干细胞进行培养约48小时后,进行ALP染色,结果可知:不含葡萄糖的DMEM组成中不含4种氨基酸的群、和不含葡萄糖的DMEM组成中仅不含谷氨酰胺的群(Gln⁻)中,人胚胎干细胞或者诱导多能性干细胞的ALP阳性集落数在24小时内大部分消失,在48小时内完全消失(图2B、图4B)。

[0144] 在图1中,考虑到人的胚胎干细胞中Cys2和Met的消耗量较多,研究了在添加了乳

酸、不含糖类的条件下 (Lactate^+ 、 Gluc^-)，使用均不含这些氨基酸的培养基，未分化干细胞（人胚胎干细胞）是否能够存活。作为培养液，以不含葡萄糖的DMEM (Invitrogen) 的组成为基础，制作/使用了添加乳酸 (4mM) (Gluc^- 、 Lactate^+ 条件)、该DMEM的基本组成中仅不含上述任意1种氨基酸（仅谷氨酰胺、仅胱氨酸、仅蛋氨酸、仅苏氨酸）的培养基（分别为“ Gln^- ”“ Cys2^- ”“ Met^- ”“ Thr^- ”），使用各培养基进行24小时细胞培养后，通过StemTAG™碱性磷酸酶染色试剂盒 (Sigma 86-R) 使细胞所具有的碱性磷酸酶 (ALP) 的活性显色，作为活细胞确认了染成红色的细胞。其结果，证实了与不含谷氨酰胺的培养基 (Gluc^- 、 Lactate^+ 、 Gln^-) 的情况相比，不含Cys2的培养基 (Gluc^- 、 Lactate^+ 、 Cys2^-) 和不含Met的培养基 (Gluc^- 、 Lactate^+ 、 Met^-) 的细胞死亡诱导活性仅具有与作为对照使用的不含苏氨酸的培养基 (Gluc^- 、 Lactate^+ 、 Thr^-) 同等程度的细胞死亡诱导活性，证实了不含谷氨酰胺的培养基 (Gluc^- 、 Lactate^+ 、 Gln^-) 的细胞死亡诱导活性最为明显 (图5)。该结果启示出：与非专利文献3和非专利文献4所示的未分化干细胞中的苏氨酸、蛋氨酸相比，不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基在消除残存的未分化干细胞的能力方面更优异。

[0145] 实施例3：对于各种培养液条件的细胞的反应性

[0146] 在本实施例中，证明了在各种培养液条件下对未分化干细胞或心肌细胞进行培养时，细胞的存活率如何变化。

[0147] 作为本实施例中使用的培养液，以不含葡萄糖的DMEM (Invitrogen) 的组成为基础，制作了添加乳酸 (4mM) (Gluc^- 、 Lactate^+) 或不添加乳酸 (Gluc^- 、 Lactate^-) 任一条件下，进而追加了仅不含精氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸这4种氨基酸中的1种（仅精氨酸、仅谷氨酰胺、仅丝氨酸或仅甘氨酸）的条件的培养基（分别为“ Arg^- ”“ Gln^- ”“ Ser^- ”“ Gly^- ”）。在上述培养条件下将未分化干细胞（人胚胎干细胞）或大鼠新生幼崽心肌细胞培养约24小时后，进行通过活细胞/死细胞同时染色试剂盒 (TaKaRa Bio, Inc.) 的染色，同时进行拍摄 (图3A和图6A)，计算了细胞存活率 (图3B和图6B)。

[0148] 使用未分化干细胞（人胚胎干细胞），观察不含图1中消耗多的各种非必需氨基酸的条件下进行培养时的未分化干细胞的生死，测定细胞存活率的结果示于图3。该结果证实了，未分化干细胞的情况无论是否添加乳酸，在不含谷氨酰胺的培养基 (“ Lactate^+ 、 Gluc^- 、 Gln^- ”或“ Lactate^- 、 Gluc^- 、 Gln^- ”) 中，存活率显著降低 (图3)。

[0149] 另一方面，使用大鼠新生幼崽心肌细胞，利用相同的方法，观察图1中消耗多的各种不含非必需氨基酸的条件下进行培养时的心肌细胞的生死，测定细胞存活率的结果示于图6。该结果证实了，新生幼崽心肌细胞的情况，通过添加乳酸，从而即使是不含谷氨酰胺的培养基 (Lactate^+ 、 Gluc^- 、 Gln^-) 的情况也显著改善存活率，即乳酸的添加使由不含谷氨酰胺的条件 (Gln^-) 所产生的细胞死亡诱导活性降低 (图6)。

[0150] 实施例4：在培养条件下由诱导多能性干细胞分化/诱导为心肌细胞

[0151] 本实施例为了明确由人诱导多能性干细胞分化/诱导为心肌细胞的顺序而进行。

[0152] • 心肌分化时，人诱导多能性干细胞达到50~90%汇合时，用添加有B27 (没有胰岛素、Invitrogen) 和CHIR99021 (Selleckchem or Wako) 6μM的RPMI培养基 (Invitrogen) 更换了培养基 (第0天)。

[0153] • 第1天~第2天，用RPMI/B27胰岛素 (-) 培养基进行了培养。

[0154] • 接着，第3天~第5天，用在RPMI/B27胰岛素 (-) 培养基中进而添加了IWP25μM或

者IWR-1 5 μ M培养基进行了培养。

[0155] • 进而,第6天~第7天,用RPMI/B27胰岛素(-)培养基进行了培养。

[0156] • 而且,第8天及之后,用RPMI/B27胰岛素⁽⁺⁾培养基进行了培养。(Lian,X.,et al.,Nat Protocol,2013,8,162-175)。第8天~第11天时,能够确认搏动的心肌细胞(图4A)。

[0157] 为了使培养液中实质上不含糖,而用PBS清洗2次(Gluc⁻),在最终加入乳酸(Wako Pure Chemical cat 129-02666)4mM的D-MEM培养液(Lactate⁺条件)中,在谷氨酰胺存在下(Gln⁺)或谷氨酰胺非存在下(Gln⁻)进行3~4天培养。乳酸浓度需要调整在1~10mM的范围内。本实施例中添加了4mM的乳酸。

[0158] 实施例5:在培养条件下的心肌分化细胞的氨基酸需求性

[0159] 在本实施例中,使用由人诱导多能性干细胞分化/诱导的心肌细胞,对在培养条件下心肌分化细胞需要哪种氨基酸进行了研究。

[0160] 在糖存在条件(图7A)、不含葡萄糖而添加乳酸的培养基(Cell Stem Cell 2013 12:127-37)(Gluc⁻,All⁺,Lactate⁺)(图7B)、添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc⁻,Gln⁻,Lactate⁺)(图7C)中培养3天后,进行免疫染色的照片示于图7。

[0161] 免疫染色时,通过4%多聚甲醛对细胞进行15至30分钟固定后,对细胞核使用DAPI(Invitrogen)以及对横纹结构使用抗 α 辅肌动蛋白抗体(Sigma)和Alexa546donkey anti-mouse IgG(Invitrogen),检测出了荧光。

[0162] 在培养3天后的免疫照片中,在不含葡萄糖而添加乳酸的培养基(有谷氨酰胺)(Gluc⁻,Gln⁺,Lactate⁺)中,针对用DAPI染色的细胞核,仅发现少数作为心肌标记的 α 辅肌动蛋白阴性的细胞(图7B),与此相对地,在添加了乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc⁻,Gln⁻,Lactate⁺)中,针对用DAPI染色的细胞核,接近100%的细胞为 α 辅肌动蛋白阳性的细胞(图7C)。

[0163] 该结果显示出,在含有谷氨酰胺的培养条件(图7B)下,除了心肌细胞以外的细胞仅少数存活,与此相对地,在不含谷氨酰胺的培养条件(图7C)下,存在心肌细胞,同时除了心肌细胞以外的细胞(未分化干细胞、非心肌细胞)被诱导细胞死亡而完全不存在。

[0164] 根据与糖代谢的路径的关系,预测产生这样的差异的机理,在普通细胞(未分化干细胞、非心肌细胞)中,虽然在糖代谢一系列的流程中,由糖酵解系统供给丙酮酸的路径、由谷氨酰胺经由谷氨酸供给 α -酮戊二酸的路径对细胞的存活给予很大帮助,但是由乳酸供给丙酮酸的路径的给予度通常维持在非常低的状态。与此相对,预测在心肌细胞中,不仅由糖酵解系统供给丙酮酸的路径、由谷氨酰胺经由谷氨酸供给 α -酮戊二酸的路径,而且实质上由乳酸供给丙酮酸的路径也对心肌细胞的存活给予帮助。

[0165] 而且该结果表明,通过在添加了乳酸不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养条件下(Gluc⁻,Gln⁻,Lactate⁺)对由人胚胎干细胞或者人诱导多能性干细胞诱导的心肌细胞(含有未分化干细胞、非心肌细胞的状态)进行培养,从而与在添加了乳酸而不含葡萄糖的培养条件下(有谷氨酰胺)(Gluc⁻,Gln⁺,Lactate⁺)进行培养时相比,能够以短时间更有效地选择性地获得心肌细胞(图7B)。

[0166] 通过0.25%Trypsin EDTA对在添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc⁻,Gln⁻,Lactate⁺)中培养4天后的心肌细胞团进行分散,接种在用涂覆纤维连接蛋白

(Sigma)的培养皿中,进行免疫染色的结果为图8。免疫染色时,用4%多聚甲醛进行固定后,使用抗 α 辅肌动蛋白抗体(Sigma)、抗肌钙蛋白I抗体(Santacruz)、抗Tra1-60(Millipore)。此处, α 辅肌动蛋白为心肌细胞特异性标记,肌钙蛋白I也为心肌细胞特异性标记,且Tra1-60为多能性干细胞特异性标记。

[0167] 其结果可知,被DAPI核染色的细胞的大部分为 α 辅肌动蛋白阳性、肌钙蛋白I阳性(图8A和图8B)。为了确认细胞是否为心肌细胞,进行了 α 辅肌动蛋白和肌钙蛋白I的双重染色,结果发现 α 辅肌动蛋白的染色细胞与肌钙蛋白I的染色细胞完全一致(图8C)。另一方面,为了确认残存未分化干细胞,对Tra1-60阳性细胞进行了确认,结果发现所有的细胞为Tra1-60阴性(图8D右上)。由此证实完全除去了未分化干细胞。

[0168] 实施例6:残存未分化干细胞的检测

[0169] 在残存未分化干细胞的检测方法中,作为灵敏度高的方法报告有通过Q-PCR对Lin28的基因表达进行定量化的方法(PLOS ONE, 2012; 7 (5) :e37342)。在添加了乳酸而不含葡萄糖的培养基(Gluc^- , All^+ , Lactate^+)与添加了乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)中对由人诱导多能性干细胞分化/诱导的心肌细胞分别进行4天纯化精制,从所得物质中提取mRNA制作了cDNA。用18S对表达水平进行归一化(normalize)的结果,发现添加了乳酸而不含葡萄糖的培养基(Gluc^- , All^+ , Lactate^+)表达了Lin28,与此相对,添加了乳酸不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)完全未表达Lin28(图9)。基于该结果也显示出,与添加了乳酸而不含葡萄糖的培养基(Gluc^- , All^+ , Lactate^+)相比,添加了乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- , Gln^- , Lactate^+)具有优异的未分化干细胞除去能力。

[0170] 实施例7:在不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基的培养下的心肌细胞中的乳酸Fluxome(代谢流速)解析

[0171] 在本实施例中,在不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养条件下,使用毛细管电泳和质谱法研究了有关心肌细胞如何代谢乳酸、是否存活的机理。

[0172] 人胚胎干细胞和新生幼崽大鼠心肌细胞中,将培养液变更为添加了4mM的 ^{13}C -标记乳酸(Isotec)的、改良的不含葡萄糖的DMEM(Invitrogen)。1小时后在10%甘露醇(Wako)中清洗这些细胞,然后回收至含有内标物(阳离子为200 μM 的L-蛋氨酸砷、而且阴离子为200 μM 的MES)的甲醇中。回收细胞和培养液,使用安装有空气压缩泵的Agilent毛细管电泳系统、Agilent 1100系列质量选择检测器质谱仪(mass selective detector mass spectrometer)、Agilent 1100系列等度高效液相色谱泵(isocratic high-performance liquid-chromatography pump)、G1603A Agilent毛细管电泳和质谱计适配器试剂盒和G1607A Agilent毛细管电泳和质谱计喷雾器试剂盒(Agilent Technologies),进行了毛细管电泳和质谱分析。相对于细胞数来校正数值。在心肌细胞中检测出显著多的TCA循环内代谢产物(图10A、B)。另一方面,在胚胎干细胞中仅发现少量这些代谢产物(图10B)。根据该事实,启示了与包含胚胎干细胞的非心肌细胞相比,心肌细胞中外来性的乳酸借助TCA循环而被更有效地代谢。令人惊奇的是,在心肌细胞中的2-氧代戊二酸和谷氨酸中检测出显著多的 ^{13}C (图10C、D)。这些结果启示了,乳酸不仅很大程度有助于利用了TCA循环的ATP产生,而且即使在培养基中不含谷氨酰胺和谷氨酸的条件下,由于乳酸有助于2-氧代戊二酸和谷氨酸的生物合成并进行补充,从而也能够使心肌细胞存活。

[0173] 实施例8:在添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件下对人诱导多能性干细胞进行分化诱导而得到的细胞群进行培养的效果

[0174] 通过与实施例4相同的方法将人诱导多能性干细胞(hiPSC)分化诱导为心肌细胞。为了对得到的细胞群(hiPSC-CMs)进行纯化精制,在以DMEM(Invitrogen)的组成为基础的、添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)中培养5天。

[0175] 用FACS分析了在添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)下自开始培养起第2天和第5天的细胞群。结果示于图11。FACS中,第2天的细胞群中的肌钙蛋白T阳性细胞为93.5%、第5天的细胞群中的肌钙蛋白T阳性细胞为98.7%。

[0176] 根据该事实,可知在添加了乳酸作为心肌细胞的能量源的、不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)下进行培养的情况能够对心肌细胞进行精制。

[0177] 实施例9:在添加了丙酮酸而不含谷氨酰胺的培养条件下的未分化干细胞和心肌细胞能否存活

[0178] 在本实施例中,研究了在添加了丙酮酸、不含谷氨酰胺的培养条件下,作为未分化干细胞的人胚胎干细胞和作为心肌细胞的大鼠新生幼崽心肌细胞能否存活。

[0179] 以不含葡萄糖的DMEM(Invitrogen)的组成为基础,制作了含有DMEM的基本组成所有氨基酸的培养基(" Gluc^- 、ALL⁺"条件);DMEM的基本组成中不含谷氨酰胺培养基(" Gluc^- 、 Gln^- "条件);DMEM的基本组成中不含谷氨酰胺而含有 α -酮戊二酸4mM的培养基(" Gluc^- 、 Gln^- 、DM- α KG⁺") ;DMEM的基本组成中不含谷氨酰胺而含有2mM丙酮酸的培养基(" Gluc^- 、 Gln^- 、Pyr⁺")。使用各培养基对人胚胎干细胞培养48小时。然后,利用StemTAGTM碱性磷酸酶染色试剂盒(Sigma 86-R)使人胚胎干细胞所具有的碱性磷酸酶(ALP)的活性显色,作为活细胞确认到了染成红色的细胞(图12)。其结果,虽然在含有 α -酮戊二酸的培养基中发现有多个ALP阳性的未分化集落,但在添加了丙酮酸的培养基中没有确认到ALP阳性的未分化集落。根据该事实,可知在不含谷氨酸的条件下,即使添加丙酮酸也会在短时间内死亡。

[0180] 接着,使用大鼠新生幼崽心肌细胞,以不含葡萄糖的DMEM(Invitrogen)的组成为基础,制作了含有DMEM的基本组成中所有氨基酸的培养基(Gluc^- 、ALL⁺)、DMEM的基本组成中不含谷氨酰胺培养基(Gluc^- 、 Gln^-);DMEM的基本组成中不含谷氨酰胺、添加了丙酮酸2mM的培养基(Gluc^- 、 Gln^- 、Pyr⁺);DMEM的基本组成中不含谷氨酰胺、添加了乳酸4mM的培养基(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)。使用各培养基对人胚胎干细胞培养48小时后,通过活细胞/死细胞同时染色试剂盒(TaKaRa Bio, Inc.)进行染色,进行拍摄(图13)。绿色表示活细胞,红色表示死细胞。在不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件下,与在不添加乳酸和丙酮酸的条件下进行培养的心肌细胞相比,在添加了作为心肌细胞的能量源的乳酸或丙酮酸的条件下进行培养的心肌细胞的存活率显著提高。根据该事实,证实了通过添加丙酮酸使由不含谷氨酰胺的条件(Gln^-)所致的心肌细胞的细胞死亡诱导活性降低。

[0181] 实施例10:残存未分化干细胞的检测

[0182] 组合使用层粘连蛋白-521和Essential 8培养基,研究了其它残存未分化干细胞的检测方法(Tano et al., PLOS ONE 2014)的检测灵敏度。评价了作为培养液使用mTeSR1、作为支架材料使用iMatrix(Nippi公司制)时的未分化干细胞检测灵敏度。首先,在使HEK293细胞的细胞群中混入人诱导多能性干细胞(hiPSC)的条件(0%)和以0.1%、0.01%或0.001%的比例混入的条件下进行拍摄(图14A)。以0.001%的比例混入人诱导多能性干

细胞时也能够检测出人诱导多能性干细胞,因此确认了通过该方法能够检测以0.001%的比例混入的未分化干细胞。

[0183] 然后,评价了源自人诱导多能性干细胞的分化细胞中残存的未分化干细胞。首先,根据实施例4的方法,将人诱导多能性干细胞分化诱导为心肌细胞并进行拍摄(图14B)。并且,为了在相同条件下对分化诱导的细胞群进行纯化精制,而以DMEM(Invitrogen)的组成为基础,在添加乳酸、不含葡萄糖而含有谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^+ 、 Lac^+)下或以DMEM(Invitrogen)的组成为基础,在添加乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)下培养4天后,进行拍摄(图14B)。在纯化精制前的细胞群和在添加了4mM的乳酸、不含葡萄糖而含有4mM的谷氨酰胺的条件下(Gluc^- 、 Gln^+ 、 Lac^+)进行纯化精制的细胞群中观察到TRA1-60阳性细胞。与此相对地,在添加了乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件下(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)进行纯化精制的细胞群中未观察到TRA1-60阳性细胞。

[0184] 根据该事实,可知在添加了乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)下,残存未分化干细胞低于0.001%。

[0185] 实施例11:针对增殖性的非心肌细胞的细胞死亡诱导活性

[0186] 在本实施例中,研究了由不含谷氨酰胺的培养条件所导致的针对增殖性的非心肌细胞的细胞死亡诱导活性。

[0187] 在DMEM(10%FBS,不含bFGF)条件下对人胚胎干细胞培养2周,得到不含心肌细胞的增殖性非心肌细胞的细胞群。该细胞群中包括成纤维细胞、除了心肌细胞以外的分化细胞。在以DMEM(Invitrogen)的组成为基础、不含葡萄糖而含有4mM的谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^+)下对该细胞群进行48小时培养后进行观察,结果发现有存活细胞(图15)。与此相对地,在添加了4mM的乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)下对增殖性非心肌细胞进行48小时培养后进行观察,结果完全未发现存活细胞,细胞完全死亡(图15)。

[0188] 根据该事实,可知在添加了乳酸、不含葡萄糖和谷氨酰胺的条件下,能够使增殖型非心肌细胞死亡。近年来,报道了不仅未分化干细胞是细胞移植后形成肿瘤的原因,而且未成熟的增殖性细胞也与细胞移植后的肿瘤形成有关(Nori,et al.,Stem Cell Report,2015),但是利用该方法不仅能够使未分化干细胞在短时间内死亡,而且还能够使增殖性细胞在短时间内死亡。

[0189] 实施例12:可以添加至精制用培养基中的化合物

[0190] 在本实施例中,研究了在精制用培养基中添加对心肌细胞来说是营养素的化合物时,未分化干细胞、非心肌的分化细胞不存活,而心肌细胞可以更长期存活的条件。

[0191] 制作了在以DMEM(Invitrogen)的组成为基础、添加乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基(Gluc^- 、 Gln^- 、 Lac^+)中分别添加了抗坏血酸(25mg/L)或白蛋白(0.1%)的培养基。

[0192] 接着,用制作的培养基培养人诱导多能性干细胞。自开始培养起24小时后进行观察,人诱导多能性干细胞在所有的培养基中均死亡(图16)。

[0193] 接着,在DMEM(10%FBS,不含bFGF)条件下对人诱导多能性干细胞培养2周,得到不含心肌细胞的增殖性的非心肌细胞的细胞群。用制作的培养基对得到的细胞群进行培养。自开始培养起48小时内细胞死亡(图17)。

[0194] 接着,利用与实施例4相同的方法将人诱导多能性干细胞分化诱导为心肌细胞。用添加了抗坏血酸或白蛋白的培养基对得到的细胞团进行培养,结果发现即使在培养600小

时后心肌细胞仍然存活(图18)。

[0195] 进而在持续细胞培养744小时后进行观察,结果发现在所有的条件中仍然有多个搏动的心肌细胞。接着,使用死细胞染色用荧光色素PI(碘化吡啶:Propidium Iodide)进行染色并观察(图19)。发现与未添加抗坏血酸和白蛋白的条件(添加(-))相比,添加了抗坏血酸或白蛋白的条件的活细胞更多。基于以上的结果,可知使用添加了抗坏血酸或白蛋白的、作为心肌细胞的能量源添加乳酸而不含葡萄糖和谷氨酰胺的培养基能够对心肌细胞进行精制。另外,可知只要使用该培养基就能够使心肌细胞更长期存活。

[0196] 产业上的可利用性

[0197] 根据本发明的第一实施方式,通过制备氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液,从而可以提供用于对未分化干细胞诱导细胞死亡的细胞培养液。仅通过使用该第一实施方式的细胞培养液进行简单地细胞培养,就能够简便地对未分化干细胞诱导细胞死亡。另外,根据本发明的第二实施方式,通过制备添加了乳酸、丙酮酸或脂肪酸但不含糖类(葡萄糖)、且氨基酸组成中不含谷氨酰胺的细胞培养液,从而可以提供用于选择性地挑选心肌细胞的细胞培养液。仅通过使用该第二实施方式的细胞培养液进行简单地细胞培养,从而能够简便地对含有人的胚胎干细胞、诱导多能性干细胞的具有多能性的干细胞等未分化干细胞、除了心肌细胞以外的分化细胞、建株细胞诱导细胞死亡,最终能够选择性地挑选心肌细胞。

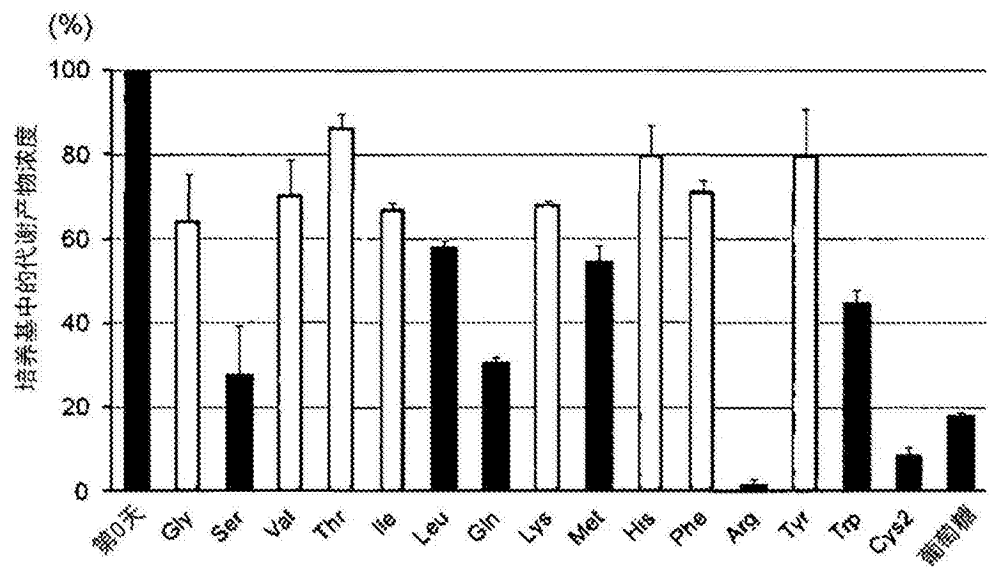


图1

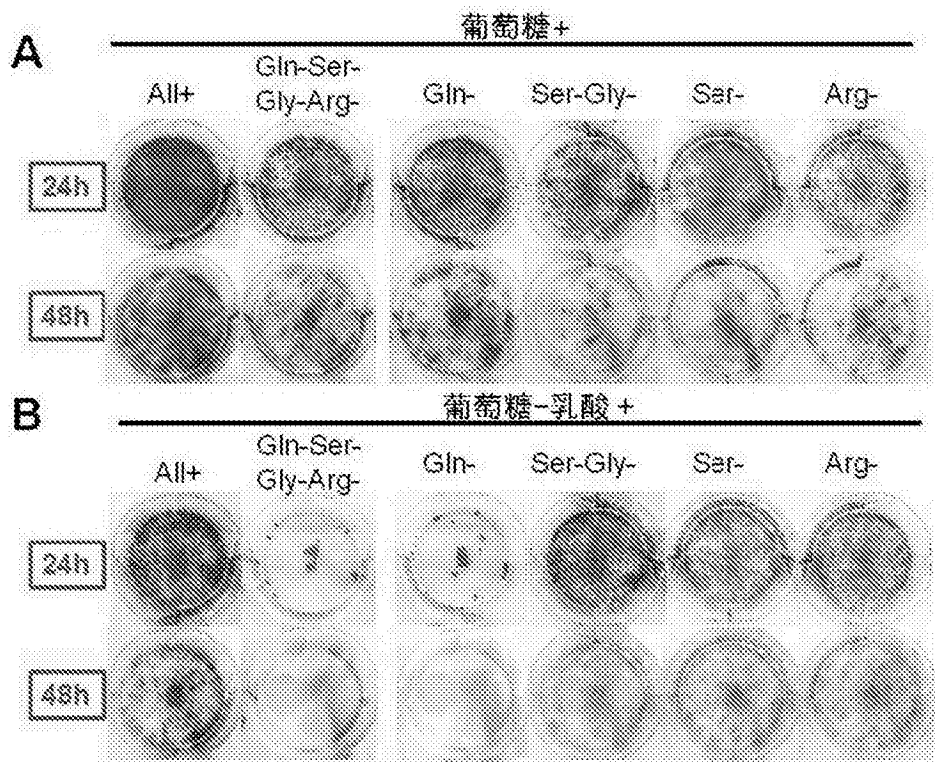


图2

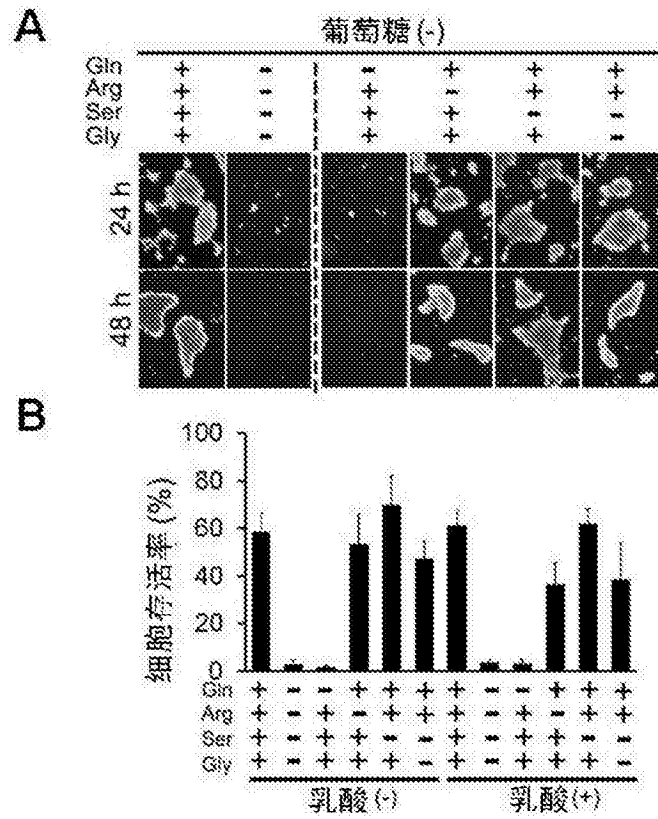
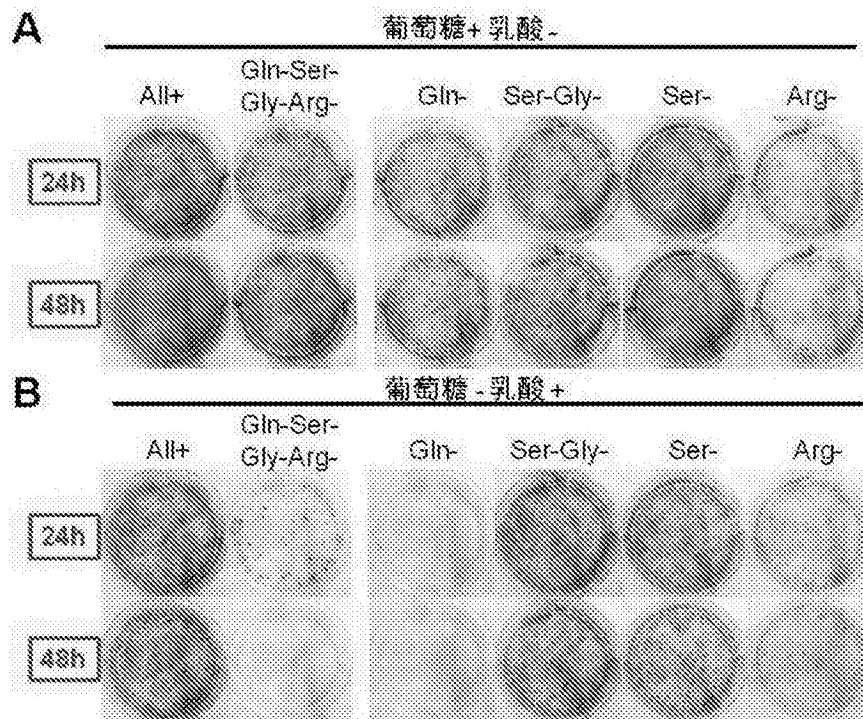


图3



人诱导多能性干细胞在各条件下的细胞存活率 (ALP染色)

图4

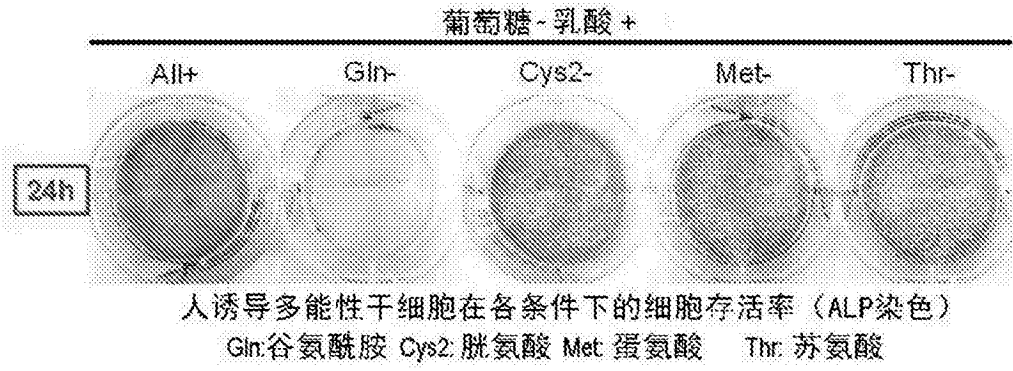


图5

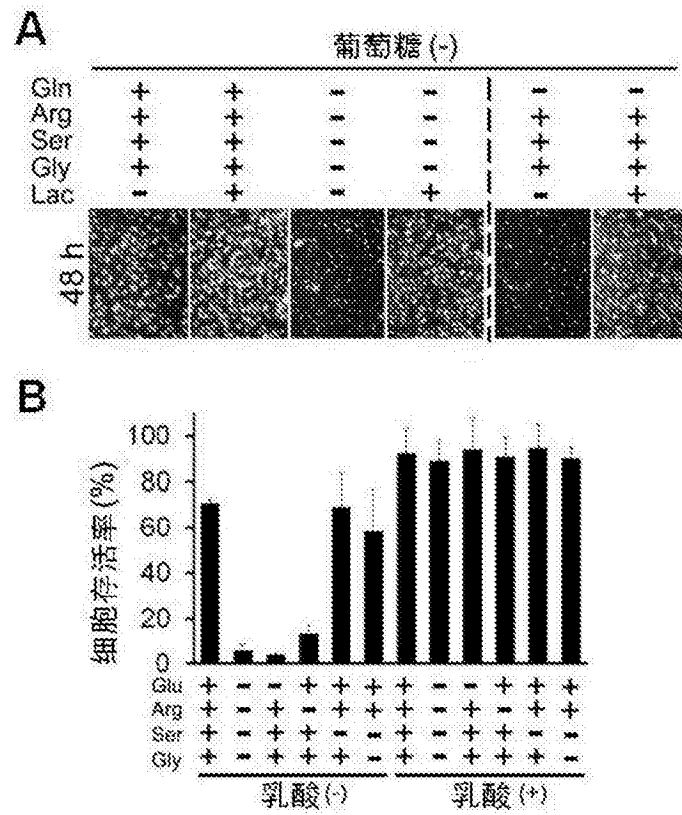


图6

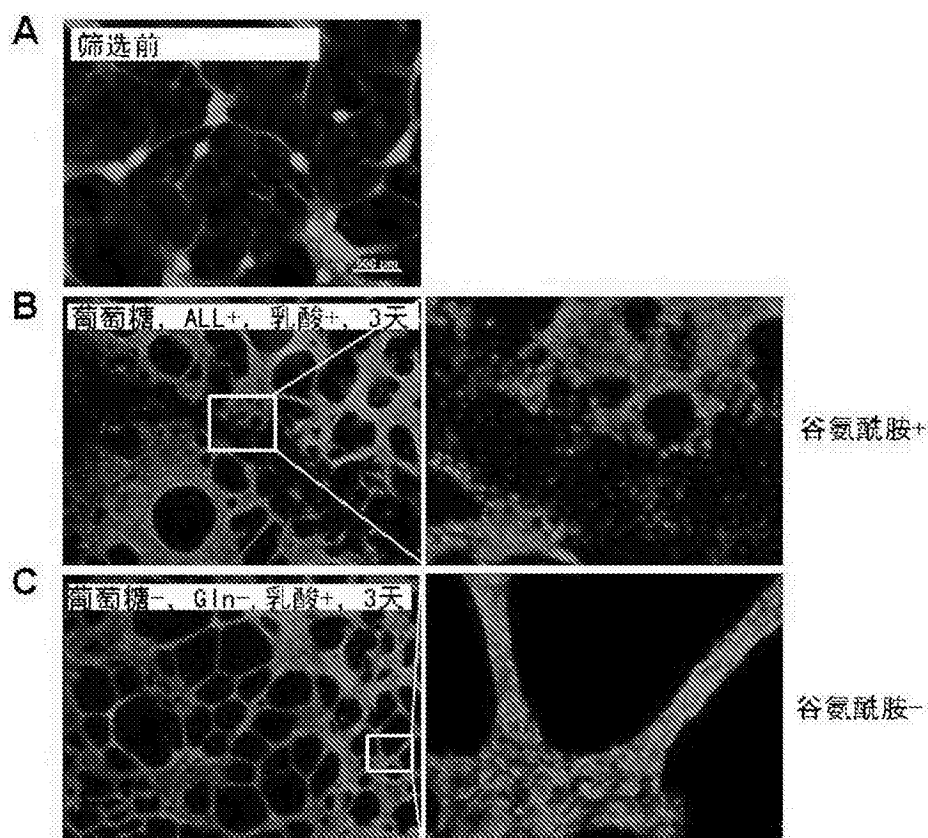


图7

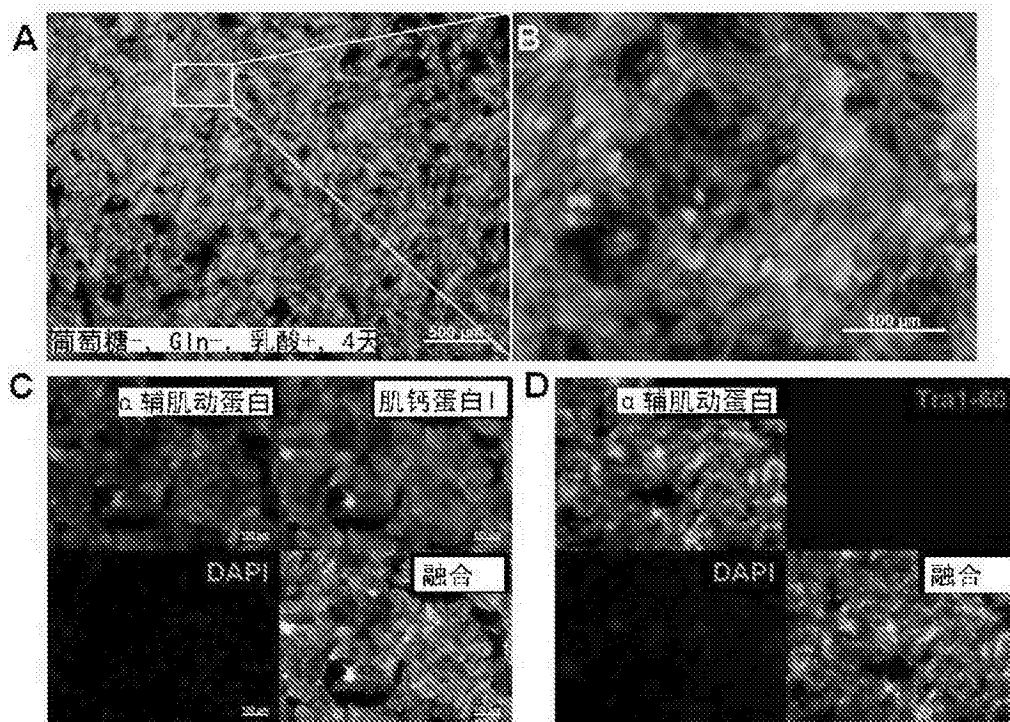


图8

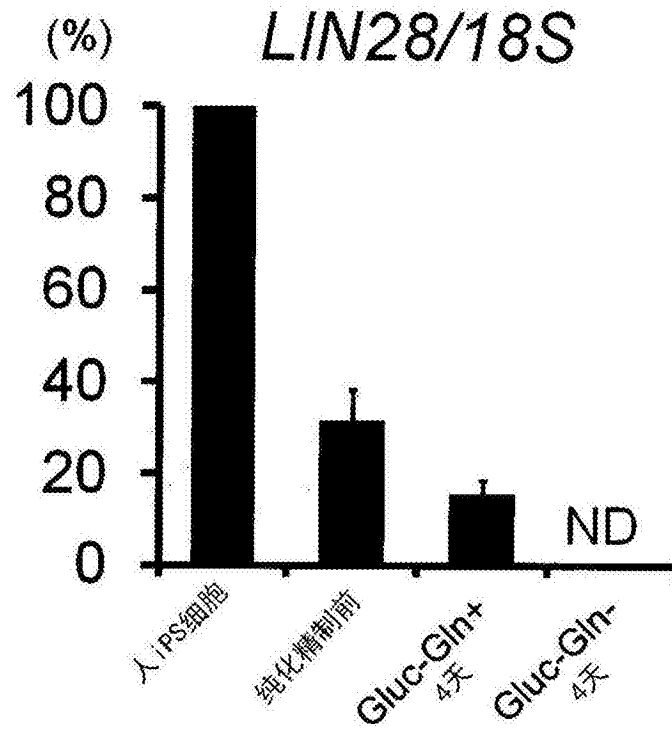


图9

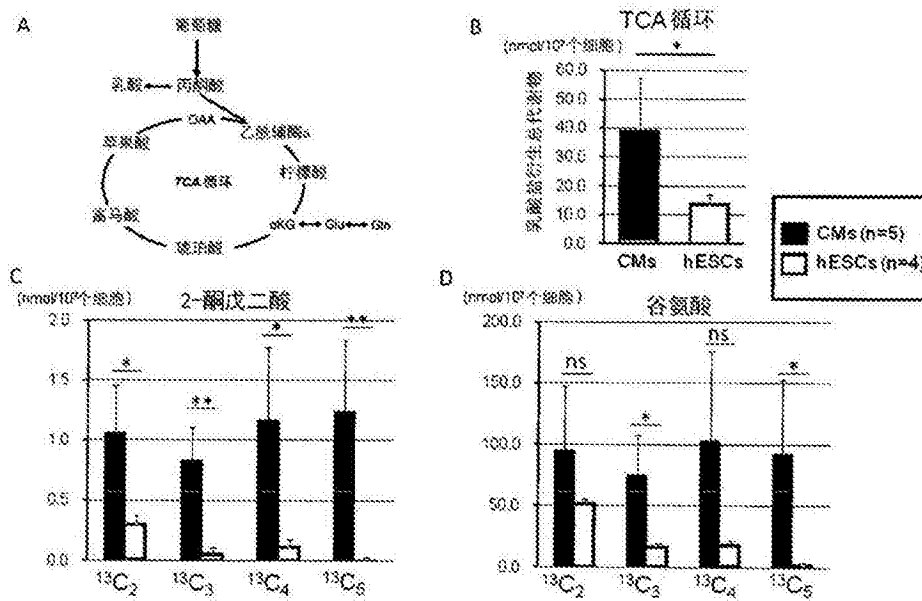


图10

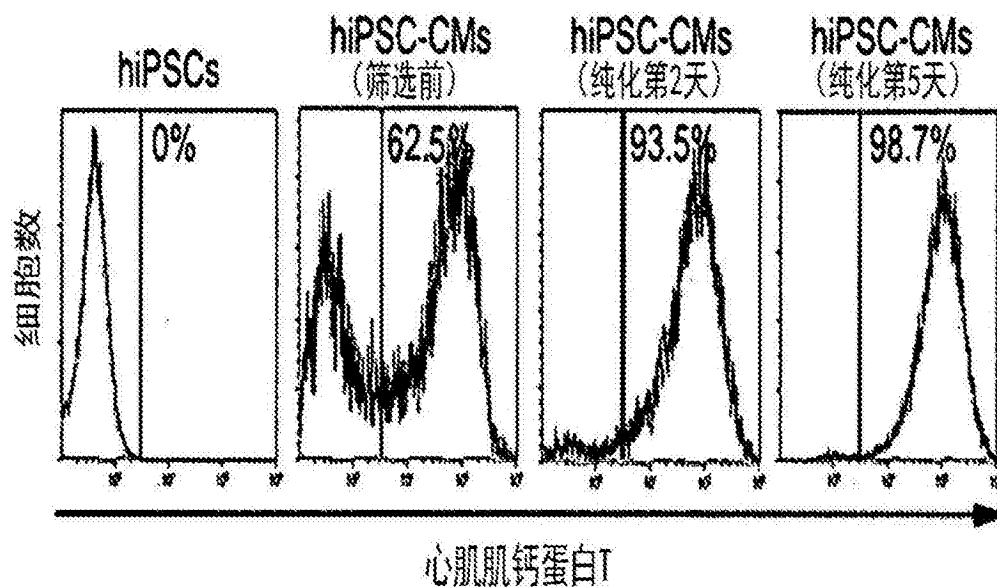


图11

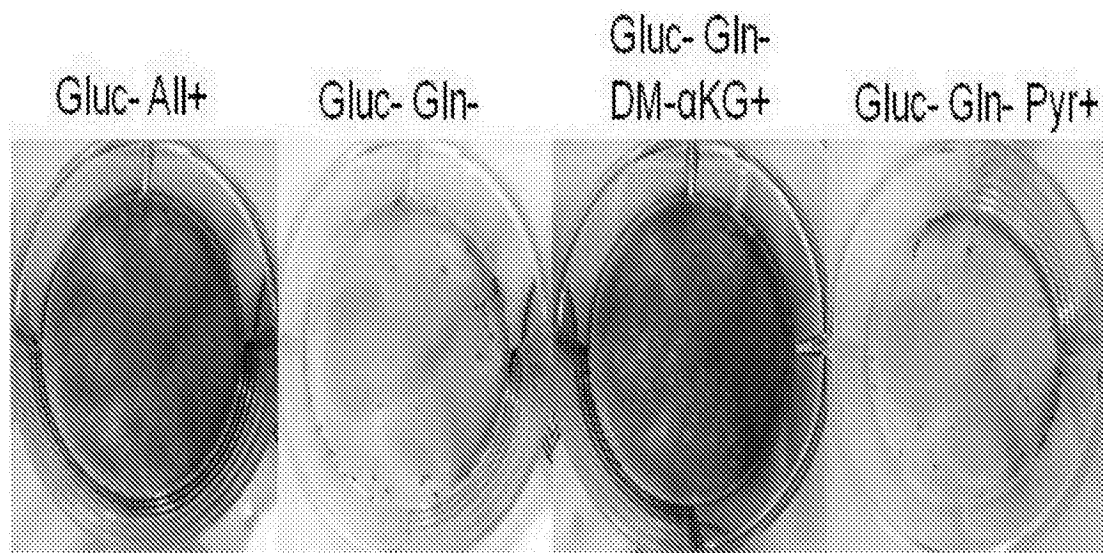


图12

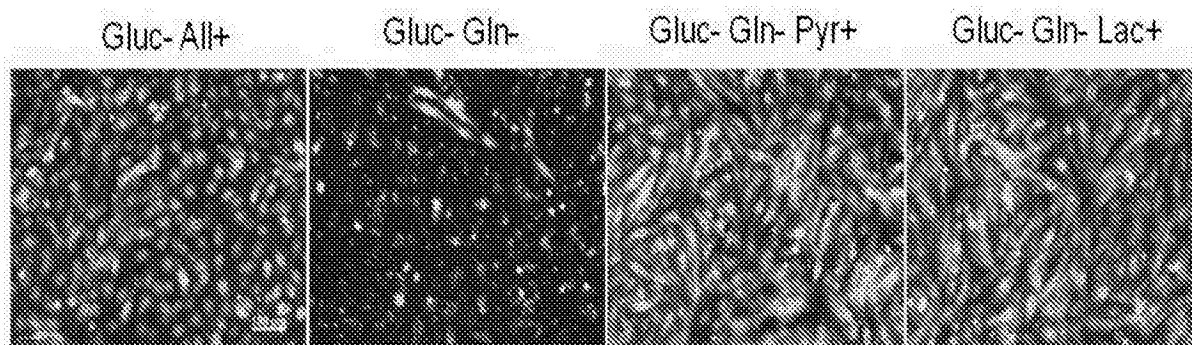


图13

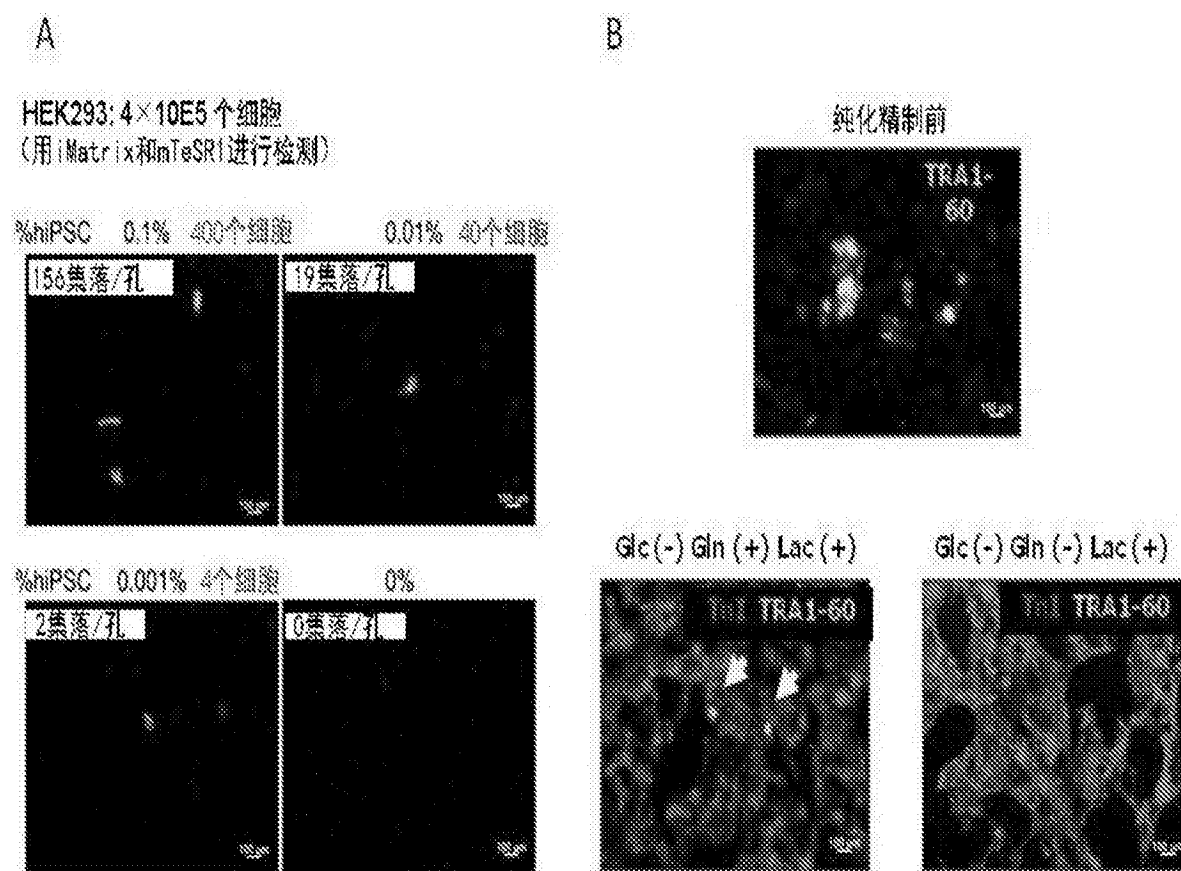


图14

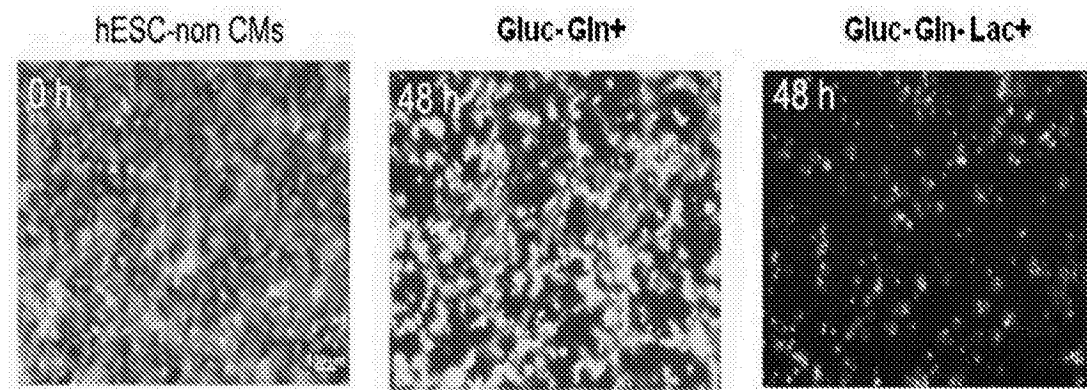


图15

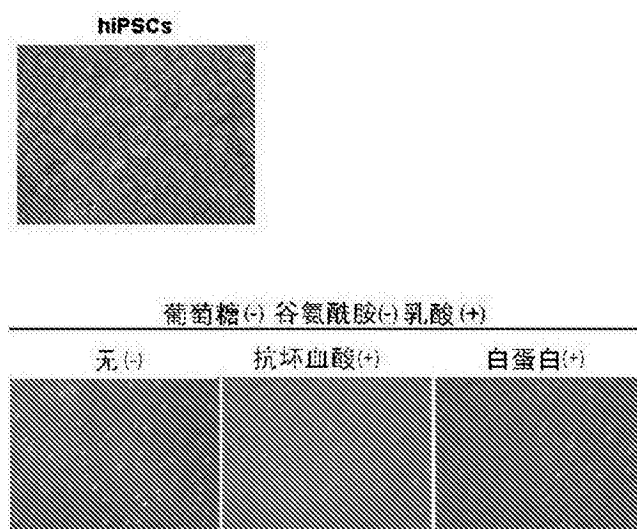


图16

源自人iPS细胞的非心肌细胞

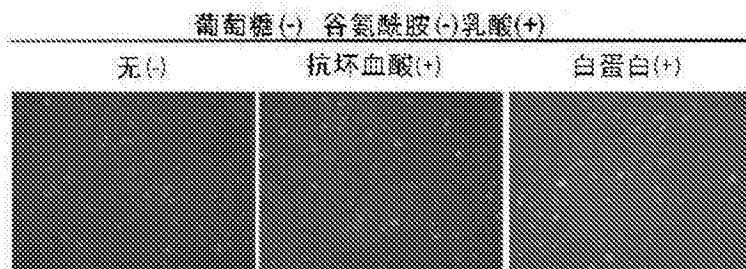
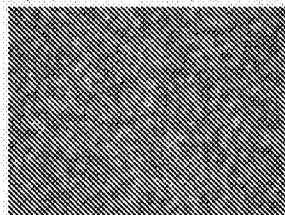


图17

源自人iPS细胞的纯化心肌细胞

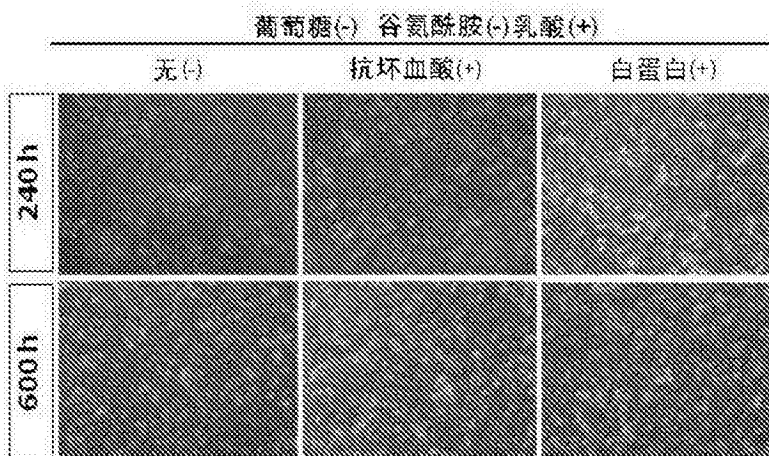
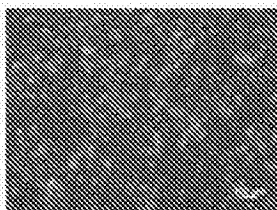


图18

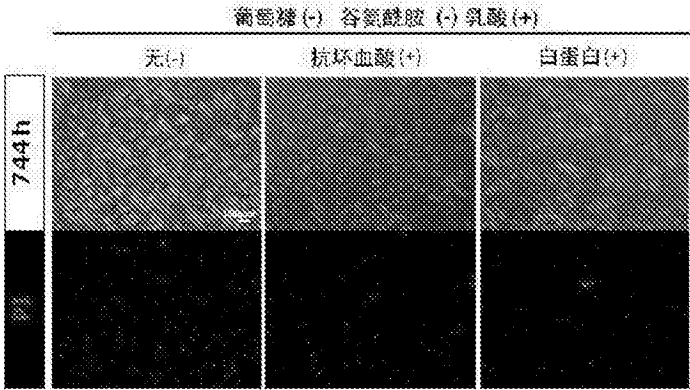


图19