

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/02

C12N 5/06



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380102403.7

[43] 公开日 2005 年 12 月 14 日

[11] 公开号 CN 1708582A

[22] 申请日 2003.10.31

[21] 申请号 200380102403.7

[30] 优先权

[32] 2002.10.31 [33] JP [31] 318052/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/014009 2003.10.31

[87] 国际公布 WO2004/039965 日 2004.5.13

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.29

[71] 申请人 独立行政法人理化学研究所

地址 日本埼玉县

共同申请人 丹羽仁史

[72] 发明人 丹羽仁史 小川和也

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 李香兰

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称 多能干细胞培养用的组合物及其使用

[57] 摘要

本发明的目的是在未使用血清或喂养细胞的培养基中培养多能干细胞，而使保持分化能的未分化多能干细胞增殖、建立。本发明通过只由补充了腺苷酸环化酶抑制基的明确的成分构成培养多能干细胞的培养基而达到上述目的。

ISSN 1008-4274

- 1、一种多能干细胞培养用的组合物，其特征在于，
5 至少含有 1 种腺苷酸环化酶活性抑制物质。
- 2、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，
是培养基补充物。
- 3、根据权利要求 1 或者 2 所述的组合物，其特征在于，
其用于在维持多能干细胞的未分化状态的同时使多能干细胞增殖。
- 10 4、根据权利要求 1~3 中任意一项所述的组合物，其特征在于，
腺苷酸环化酶活性抑制物质是从由 SQ22536 (9-(四氢-2-呋喃基)-
一腺嘌呤)、2', 5'-二脱氧腺苷、9-环戊基腺嘌呤、2', 5'-二
脱氧腺苷 3'-二磷酸、2', 5'-二脱氧腺苷 3'-一磷酸和 MDL-12330A
(顺-N-(2-苯基环戊基)氮杂环十三碳-1-烯-2-胺) 组成的组中
15 进行选择。
- 5、根据权利要求 1~3 中任意一项所述的组合物，其特征在于，
腺苷酸环化酶活性抑制物质是从促肾上腺皮质激素 (ACTH)、脑钠
利尿肽 (BNP) 和下垂体细胞腺苷酸环化酶活化肽 (PACAP) 及实质上具
有与它们相同的生理活性的肽中进行选择。
- 20 6、一种多能干细胞培养用的培养基，其特征在于，
含有权利要求 1~5 中任意一项所述的组合物。
- 7、根据权利要求 6 所述的培养基，其特征在于，
不含有喂养细胞和/或血清。
- 8、根据权利要求 6 所述的培养基，其特征在于，
25 不含有喂养细胞和血清。
- 9、根据权利要求 6~8 中任意一项所述的培养基，其特征在于，
是细胞培养用最低限量培养基。
- 10、根据权利要求 6~9 中任意一项所述的培养基，其特征在于，
还含有分化抑制因子、血清替代物和抗氧化剂。
- 30 11、一种多能干细胞的培养方法，是用于在维持多能干细胞的未分化

状态的同时使多能干细胞增殖或建立的多能干细胞的培养方法，其特征在于，

在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下进行该培养。

12、根据权利要求 11 所述的培养方法，其特征在于，
5 抑制腺苷酸环化酶活性的条件伴随使用腺苷酸环化酶活性抑制物质。

13、根据权利要求 11 或者 12 所述的培养方法，其特征在于，
在权利要求 6~10 中任意一项所述的培养基中进行培养。

14、根据权利要求 11~13 中任意一项所述的培养方法，其特征在于，
多能干细胞为 ES 细胞。

10 15、根据权利要求 11~14 中任意一项所述的培养方法，其特征在于，
多能干细胞源于哺乳动物。

16、根据权利要求 15 所述的培养方法，其特征在于，
多能干细胞源于人。

15 17、一种未分化状态的多能干细胞克隆团的调制方法，其特征在于，
在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下，培养未分化状态的多能干细胞。

18、一种未分化状态的多能干细胞克隆团的调制方法，其特征在于，
从生物体中分离未分化状态的多能干细胞，在抑制腺苷酸环化酶活性的
的条件下，培养未分化状态的多能干细胞。

19、根据权利要求 17 或者 18 所述的调制方法，其特征在于，
20 抑制腺苷酸环化酶活性的条件伴随使用腺苷酸环化酶活性抑制物质。

20、根据权利要求 17~19 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，
在权利要求 6~10 中任意一项所述的培养基中进行培养。

21、根据权利要求 17~20 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，
培养 1 个多能干细胞而得到其克隆团。

25 22、根据权利要求 17~21 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，
将在比通过邻近的多能干细胞之间的相互作用诱导该多能干细胞的
未分化增殖更低密度的接种条件中的多能干细胞，在权利要求 7 或 8 所述
的培养基中进行培养。

23、根据权利要求 17~22 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，
30 在权利要求 7 或 8 所述的培养基中培养 1 个多能干细胞而得到其克隆

团。

24、根据权利要求 17~23 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，多能干细胞为 ES 细胞。

5 25、根据权利要求 17~24 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，多能干细胞源于哺乳动物。

26、根据权利要求 17~25 中任意一项所述的调制方法，其特征在于，多能干细胞源于人。

27、一种未分化多能干细胞克隆团，其特征在于，通过权利要求 17~26 中任意一项所述的调制方法而得到。

10 28、腺苷酸环化酶活性抑制物质的使用，其特征在于，用于在维持多能干细胞的未分化状态的同时进行培养，使多能干细胞增殖或建立。

29、含有腺苷酸环化酶活性抑制物质的组合物的使用，其特征在于，用于在维持多能干细胞的未分化状态的同时进行培养，使多能干细胞
15 增殖或建立。

多能干细胞培养用的组合物及其使用

5

技术领域

本发明涉及多能干细胞培养用的组合物及其使用，特别是涉及使多能干细胞在不存在喂养细胞或血清的培养基中的培养成为可能的组合物和含有该组合物的培养基、以及它们的使用。

10

背景技术

多能干细胞是具有向属于外胚层、中胚层、内胚层的至少每一种的分化细胞分化的能力且可以自我复制的干细胞，包括胚胎干细胞（embryonic stem cell: ES 细胞）、胚胎生殖细胞（embryonic germ cell: EG 细胞）、胚胎癌细胞（embryonic carcinoma cell: EC 细胞）、多能成熟祖细胞（multipotent adult progenitor cells: MAP 细胞）、成熟多能干细胞（adult multipotent stem cells: APS 细胞）等。以下，以它们当中的 ES 细胞为例，详细说明本发明。

ES 细胞是来源于在初期胚胎中存在的多能干细胞团的细胞株，具有向包括生殖细胞在内的多种细胞分化的能力，在特定的培养条件下维持其多能性，而且可以使其增殖。如果将在这种条件下培养的 ES 细胞注入胚胎或桑椹胚中，会产生嵌合体（chimera）动物（具有 2 种不同基因组的动物）。通过使具有来源于已进行基因操作的 ES 细胞的生殖细胞的嵌合体动物交配，可以产生具有被操作的基因的动物个体。因此，ES 细胞被广泛应用于包括基因敲除小鼠（特定基因的功能被改变的小鼠）在内的转基因动物的生成。另外，在培养皿内分化诱导 ES 细胞而得到特定的分化细胞的技术也正被开发。通过把该技术应用于人 ES 细胞，可以得到细胞移植治疗所必需的分化细胞，所以也期待着将来在医疗领域的 ES 细胞的利用。

如上所述，在不使 ES 细胞分化且保持其多能性（分化能）的状态下，

增殖或建立的培养技术已经被开发。即，向培养 ES 细胞的培养基中通常加入血清（如胎牛血清（fetal calf serum: FCS）、马血清、山羊血清）。血清抑制 ES 细胞的分化，并提供促进增殖或建立的各种液体性因子，但这些因子到目前为止还没有被确认。另外，由于血清在批号之间的变动大，
5 所以有必要通过需要大量劳力的预备筛选来进行适当的分选。

另外，作为另一种培养技术，ES 细胞使用失活且使其增殖停止的胎儿性原代培养成纤维细胞或 STO 细胞等作为喂养细胞，并被培植在喂养细胞上而被培养。此时，考虑到喂养细胞不仅提供用于使 ES 细胞粘附的基质，而且抑制 ES 细胞的分化、还释放促进增殖的各种液体性因子。作为这种液体性因子之一，已知有白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor : LIF）（美国专利第 5187077 号），由于它具有对来源于各种动物的 ES 细胞的分化抑制能力，所以在多数情况下配合使用血清、喂养细胞、LIF。
10 另外，通过向含血清培养基中加入大量的重组 LIF 蛋白质，在涂有明胶的培养板上培养喂养细胞非依赖性 ES 细胞也成为可能（美国专利第 5166065 号）。

在要把来源于人 ES 细胞的分化细胞应用于细胞移植治疗时，如同上述的血清或喂养细胞的使用会产生大问题。即，人 ES 细胞的培养通常使用含有胎牛血清的培养基，将失活的小鼠胎儿性原代培养成纤维细胞作为喂养细胞进行，但这些异种动物来源的生物体成份经常会成为未知病原体的感染源。另外，在美国食品医药局的草案中，与异种细胞共培养的人细胞的移植被认为是异种移植（xenotransplantation），成为被移植者的生活限制。
20

因而，在对 ES 细胞这样的多能干细胞的细胞生物学特性的分析和其医学应用中，对于其分离、培养，明确希望使用不含异种动物来源的感染源或异种细胞的培养基，即不含喂养细胞和血清的且人工可以调制的成份明确的培养基而进行。
25

进行了响应这种要求的各种研究并提出了解决方案。作为其中的代表例子，有通过向含血清的培养基中加入大量的重组 LIF 蛋白质而在涂有明胶的培养板上培养喂养细胞非依赖性的 ES 细胞的方法（美国专利第 5166065 号）。另外，提出了含有特定的替代物来代替血清的胚胎干细胞
30

培养用培养基（特开 2001-508302 号公报），在喂养细胞存在的条件下，使通过不含血清的培养基进行培养成为可能。但是，即使向培养基提供大量的重组 LIF 蛋白质，使用含有特定的替代物来代替血清的且成份明确的培养基，在涂有明胶的培养板上培养喂养细胞非依赖性的 ES 细胞是不可能的。即，在过去的技术中，如果使用血清替代物代替血清培养，即使是喂养细胞非依赖性多能干细胞，在涂有明胶的培养板上且在低密度接种条件下使其增殖或建立是不可能的。

另外，为了进行 ES 细胞的建立或遗传操作，甚至在低密度接种条件下也有必要使 ES 细胞增殖，但在上述条件下不满足该要求。

10

发明内容

本发明的技术上的目的是使这种过去为不可能的，通过在不使用喂养细胞和血清且可以人工调制的成份明确的培养基培养多能干细胞的培养成为可能。

15 本发明人等为了解决上述课题而进行了各种研究，结果发现当在维持未分化状态的同时使多能干细胞增殖或建立时，在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下进行该培养，由此能够解决上述课题，并根据该想法完成了本发明。

产生“抑制腺苷酸环化酶活性的条件”的最典型的具体例子，是将腺苷酸环化酶活性抑制物质加入或配合到多能干细胞的培养基中。由此，在该培养基中即使不存在喂养细胞或血清，也不使多能干细胞分化、在保持其分化能的情况下使增殖或建立成为可能。

因而，本发明的主要目的是提供至少含有 1 种腺苷酸环化酶活性抑制物质的多能干细胞培养用的组合物。另一个目的是提供含有这种组合物的多能干细胞培养用的培养基。还有一个目的是提供使用这样的培养基的多能干细胞的培养方法。还有一个目的是提供在上述培养基中培养的、被增殖或建立的未分化多能干细胞。对于本领域的技术人员来说，会从以下记载的本发明的详细说明中理解这些及其它目的。

25 本发明的一个方案提供至少含有 1 种腺苷酸环化酶活性抑制物质的多能干细胞培养用的组合物。本发明的组合物是根据情况的培养基补充物。

本发明的组合物是用于在维持多能干细胞的未分化状态的同时使多能干细胞增殖的组合物。优选该腺苷酸环化酶活性抑制物质选择自 SQ22536 (9- (四氢-2-呋喃基)-腺嘌呤)、2', 5'-二脱氧腺苷、9-环戊基腺嘌呤、2', 5'-二脱氧腺苷 3'-二磷酸、2', 5'-二脱氧腺苷 3'-
5 一一磷酸和 MDL-12330A (顺-N-(2-苯基环戊基)氮杂环十三碳-1-烯-2-胺) 组成的组, 或从促肾上腺皮质激素 (ACTH)、脑钠利尿肽 (BNP) 和下垂体细胞腺苷酸环化酶活化肽 (PACAP) 以及实质上具有与其相同的生理活性的肽中选择。

本发明的其他方案提供含有上述任意组合物的多能干细胞培养用的
10 培养基。优选该培养基不含有喂养细胞和/或血清。进一步优选该培养基不含有喂养细胞和血清。这些培养基可以是细胞培养用的最低限量培养基, 另外, 还可以含有分化抑制因子、血清替代物和抗氧化剂。

本发明的另一个方案是提供一种方法, 是用于在维持多能干细胞的未分化状态的同时使多能干细胞增殖或建立的多能干细胞的培养方法, 其特征
15 在于, 在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下进行该培养。优选抑制腺苷酸环化酶活性的条件为伴随使用腺苷酸环化酶活性抑制物质的条件。另外, 本培养方法可以在上述培养基中进行。

在本发明的培养方法中, 多能干细胞优选为 ES 细胞。另外, 多能干细胞可以来源于哺乳动物。进而, 多能干细胞可以来源于人。

20 另外, 提供用上述方法增殖或建立的并保持多能性的未分化多能干细胞。

在本发明的另外一个方案提供一种未分化状态的多能干细胞克隆团的调制方法, 其特征在于, 在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下培养未分化状态的多能干细胞。另外, 还提供一种未分化状态的多能干细胞克隆团的
25 调制方法, 其特征在于, 从生物体中分离未分化状态的多能干细胞, 在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下培养未分化状态的多能干细胞。抑制腺苷酸环化酶活性的条件优选是伴随使用腺苷酸环化酶活性抑制物质的条件。另外, 用本调制方法的培养可以在上述培养基中进行。

优选本调制方法的特征在于, 培养 1 个多能干细胞而得到其克隆团。
30 团。或者, 本调制方法的特征在于, 将在与通过邻近的多能干细胞之间的

相互作用来诱导该多能干细胞的未分化增殖相比更低密度的接种条件下的多能干细胞，用上述培养基进行培养而得到其克隆团；或将在不存在喂养细胞和/或血清且不存在上述组合物的条件下不发生未分化增殖的多能干细胞，用上述培养基进行培养而得到其克隆团。特别优选的特征在于，
5 用上述培养基对 1 个多能干细胞进行培养而得到其克隆团。

在上述调制方法中，多能干细胞优选为 ES 细胞。另外，多能干细胞可以是哺乳动物来源的。进而，多能干细胞可以是人来源的。

另外，本发明提供用上述调制方法得到的未分化多能干细胞克隆团。

本发明的另一个方案是用于在维持多能干细胞的未分化状态的同时
10 进行培养并使多能干细胞增殖或建立的腺苷酸环化酶活性抑制物质或含有腺苷酸环化酶活性抑制物质的组合物的使用。

通过本发明，在不使用血清和喂养细胞且成份明确的培养基中培养多能干细胞，可以使保持多分化能的未分化多能干细胞增殖或建立。其结果，已增殖或建立的多能干细胞不会被来源于血清和喂养细胞的病原体所污染，而且，可以避免基于与异种细胞的共培养的特别的限制。
15

附图说明

图 1 是表示在通过特定肽的补充且不存在血清和喂养细胞情况下的未分化 ES 细胞的增殖的图（照片）。
20

具体实施方式

在本说明书中，“多能性”是指能够向属于外胚层、中胚层、内胚层的任意分化细胞分化的能力和向分别属于外胚层、中胚层、内胚层的至少 1 种分化细胞分化的能力，向生殖细胞的分化能力也被包括在该定义中。

25 “多能干细胞”是指具有能够向属于外胚层、中胚层、内胚层的任意分化细胞分化的能力以及向属于外胚层、中胚层、内胚层的至少各 1 种的分化细胞分化的能力（多分化能力）的可以自我复制的干细胞，包括 ES 细胞、EG 细胞、EC 细胞、MAP 细胞、APS 细胞等。作为其代表例子的“胚胎干细胞（ES 细胞）”具有多分化能力，如果被注入其它胚泡中，
30 能够分化成也包括生殖细胞的各种细胞。

“喂养细胞”是指其自身不能增殖但具有代谢活性，通过产生各种代谢物质，有助于培植于其中的其它细胞的增殖的细胞（参照村松正实等：

《分子细胞生物学辞典》367 页（1997）年）（株）东京化学同人发行）。

例如，在是 ES 细胞的情况下，使用失活并使增殖停止的胎儿性原代培养
5 成纤维细胞或 STO 细胞作为喂养细胞。

“喂养细胞非依赖性多能干细胞”是指在血清的存在下、在不含喂养细胞的培养条件下可以增殖的多能干细胞。本来在这样的培养条件下，未分化增殖培养多能干细胞是困难的，但通过继续传代培养，会获得喂养细胞非依赖性。

10 由本发明提供的多能干细胞培养用的组合物，其特征在于，含有至少一种腺苷酸环化酶活性抑制物质。腺苷酸环化酶是使 ATP 生成 cAMP（环化 AMP）的酶，是细胞的信号传递中的中心酶。该酶活性主要借助 G 蛋白质偶联型受体而由各种细胞外信号调节，产生的 cAMP 发挥作为细胞内第 2 信使的作用。在哺乳动物中，到目前为止，在人、小鼠、大鼠、牛、
15 狗、兔子等中已有报道的有共计 10 种腺苷酸环化酶的存在（例如，Patel, TB et al., Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyClase signaling and function, Gene, 269, 13—25, 2001）。关于人体中的 9 种、小鼠中的 5 种的基因已被分离出来，由从小鼠分离出的基因也都被排列整齐地保存在人基因中的事实，和这些分子在细胞增殖控制等基本生命现象
20 中是不可缺少的事实，可以认为多能干细胞中的腺苷酸环化酶的功能也是在这些动物种类中共有的。

作为本发明的多能干细胞培养用的组合物而使用的腺苷酸环化酶活性抑制物质，既可以是在细胞内和细胞外信号传递通路的任意阶段发挥作用的物质，也可以是从结果上抑制腺苷酸环化酶的活性的物质。因而，例
25 如，能够使用将导致腺苷酸环化酶的活性抑制的细胞外信号提供给受体的物质、或直接妨碍腺苷酸环化酶的物质，也能够使用具有作用于对受体与腺苷酸环化酶之间的信号传递进行介导的分子的物质。

为了检验某种物质是否抑制多能干细胞的腺苷酸环化酶的活性，只要将该物质加入需要增殖或建立的细胞（如 ES 细胞）的培养培养基中，观
30 察 cAMP 生成的抑制程度即可。

在直接妨碍腺苷酸环化酶的物质例子中，可以举出：SQ22536（9—（四氢—2—呋喃基）—腺嘌呤）、2'，5'—二脱氧腺苷、9—环戊基腺嘌呤、2'，5'—二脱氧腺苷 3'—二磷酸、2'，5'—二脱氧腺苷 3'—一磷酸、MDL—12330A（顺—N—（2—苯基环戊基）氮杂环十三碳—1—烯—2—胺）等的化合物，这些被 CALBIOCHEM—NOVABIOCHEM CORPORATION（California, USA）等在市场上出售，能够容易地得到。这些物质的使用量可根据其种类而适当地确定。例如，在使用 SQ22536 的情况下，对其培养基中的终浓度没有特别限制，一般以 1 μ M~10mM、优选 10 μ M~1mM 的终浓度的量使用。

10 作为在多能干细胞中抑制腺苷酸环化酶的活性的物质的其他例子，可以举出如下所示的肽：促肾上腺皮质激素（corticotropin, adrenocorticotrophic hormone: ACTH）、脑钠利尿肽（brain natriuretic peptide: BNP）、下垂体细胞腺苷酸环化酶活化肽（pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: PACAP）等。

15 另外，也可使用实质上具有与这些肽相同的生理活性的肽，即在组成上述 ACTH、BNP、PACAP 等肽的氨基酸序列中缺失、取代和/或添加一个或其以上的氨基酸其具有与相应全长肽相同的生理活性的肽。例如，已知 ACTH 是由 39 个氨基酸组成的肽（ACTH（1—39）），N 末端 1~24 的氨基酸是各动物共通的，25~33 的氨基酸根据物种而不同，而在 N 末端 20 1~18 具有促肾上腺皮质作用，但本发明中除了 ACTH（1—39）之外，还可以使用作为其片段的 ACTH（1—24）、ACTH（11—24）等。这些肽一般以 1nM~100 μ M、优选 1~10 μ M 的终浓度的量使用。

上述的 ACTH、BNP、PACAP 等及其片段自身被记载在任何文献中（例如，美国专利公报第 4415546 号；今崛和友等：生化学辞典（第 3 版）25 1178~1179 页、721 页和 286~287 页（1998）（株）东京化学同人），或者作为试剂被出售，或者可以按照文献记载的方法进行制造。例如，这些肽可以用本领域的技术人员所周知的用于组建所需的氨基酸序列的合成方法生成。另外，也能够通过如下所示的基因操作来制造这些肽，即将编码这些肽的基因导入大肠杆菌等宿主细胞中，表达蛋白并将其分离、纯化。30

本发明的组合物既可以含有单一的腺苷酸环化酶活性抑制物质，也可以以任意组合含有多个腺苷酸环化酶活性抑制物质。因而，可以使用含有多种化合物的组合物、含有多种肽的组合物和含有化合物和肽两者的组合物等。或者，本发明的组合物也可以只由单一的腺苷酸环化酶活性抑制物质构成。

根据本发明，提供添加了上述组合物的多能干细胞培养用的培养培养基。由于该组合物是源于喂养细胞或血清的液体性因子的取代物，所以即使在培养培养基中存在喂养细胞或血清也不会给多能干细胞的培养带来影响，但如果存在喂养细胞或血清，则不能避免由源于它们的病原体造成的污染和作为异种抑制的特别的限制。因而，作为培养培养基优选使用不含喂养细胞和/或血清的培养基，作为培养基更优选使用不含喂养细胞和血清的培养基。

即，本发明的培养培养基，是优选将细胞培养用最低限量培养基（cell culture minimum medium: CCMM）作为基础培养基，使其中含有分化抑制因子、血清替代物、抗氧化剂（例如，2-巯基乙醇（2-ME）、二硫苏糖醇、抗坏血酸）和上述的本发明的组合物（即，腺苷酸环化酶活性抑制物质）的培养基；是不含喂养细胞或血清的培养基。如同以下说明的，这些 CCMM、分化抑制因子、血清替代物、抗氧化剂和上述的本发明的组合物，由于都是可以人工调制的已知物质，所以由它们构成的本发明的培养培养基能够避免以生物体成份的使用为起因的未知病原体所引起的污染。

用作基础培养基用的“细胞培养用最低限量培养基（CCMM）”，是指在其中含有分化抑制因子、血清替代物、抗氧化剂和本发明的组合物的情况下，使多能干细胞的未分化增殖成为可能的任意培养基。

在 CCMM 中，通常添加标准无机盐（锌、铁、镁、钙、钾等）、维生素、葡萄糖、缓冲系、必需氨基酸等。作为其具体例子可以举出：Delbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）、最低必需培养基（MEM），Basal essential Eagle（BME）、RPMI1640、F-10、F-12、 α -最低必需培养基（ α MEM）、Glasgow's Minimal essential Eagle（GMEM）、Iscove's Modified Dulbecco's Medium 等，也可使用出售的培养基。

最优选的 CCMM 是表 1 的组成的 GMEM。

表 1

成份	浓度 (mg/L)
CaCl ₂ (无水)	200.00
Fe (NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄ (无水)	97.67
NaCl	6400.00
NaHCO ₃	2750.00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	107.80
D-葡萄糖	4500.00
酚红	16.00
L-精氨酸 · HCl	42.00
L-半胱氨酸 · HCl	31.29
L-谷氨酰胺	292.00
L-组氨酸 · HCl · H ₂ O	21.00
L-异亮氨酸	52.40
L-亮氨酸	52.40
L-赖氨酸 · HCl	73.10
L-蛋氨酸	15.00
L-苯丙氨酸	33.00
L-苏氨酸	47.60
L-色氨酸	8.00
L-酪氨酸 · 2Na · 2H ₂ O	52.19
L-缬氨酸	46.80
D-泛酸 Ca	2.00
氯化胆碱	2.00
叶酸	2.00
i-肌醇	3.60
烟酰胺	2.00
盐酸吡哆醛	2.00
核黄素	0.20
盐酸硫胺素	2.00

5 优选向 CCMM 中加入 0.1mM 非必需氨基酸和 1mM 丙酮酸钠。非必

需氨基酸是 L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸的混合物，例如，使用市售的非必需氨基酸作为 MEM 非必需氨基酸溶液 10mM 液体（non-essential amino acids solution 10mM liquid）（Invitrogen）。丙酮酸钠使用例如作为 MEM 丙酮酸钠溶液 100mM 液体（Sodium pyruvate solution 100mM liquid）（Invitrogen）而被出售的物质。

分化抑制因子是喂养细胞和多能干细胞自身释放的液体性因子，抑制未分化细胞的分化。作为代表性分化抑制因子，可以举出白血病抑制因子（LIF）。分化抑制因子是原本存在于生物体中的物质，所以从生物体中的提取也是可能的，但也为了防止病原体的污染，另外也为了节约，优选使用人工合成的分化抑制因子。例如，在 LIF 这样的蛋白质性的分化抑制因子的情况下，优选使用通过基因操作制造的重组分化抑制因子蛋白质。

作为抗氧化剂，可以使用 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、抗坏血酸等，通常使用 2-巯基乙醇。这些物质是市售的，能够容易得到。

血清替代物是指通过将其加入到无血清培养培养基中而可以喂养多能干细胞增殖的物质。血清替代物既可以是单一物质，也可以是混合物，具体地讲，是含有从如下所示的物质中选择的 1 种或其以上的成份的物质，即白蛋白（如牛血清白蛋白）或白蛋白替代物（例如，牛下垂体提取物、米水解物、胎牛白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、牛胚提取物、AlbuMAX I（注册商标））、氨基酸（例如甘氨酸、L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-一半胱氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-亮氨酸、L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-蛋氨酸、L-脯氨酸、L-羟(基)脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸）、维生素、运铁蛋白或运铁蛋白替代物（例如乙二胺四乙酸、乙二醇一双（ β -氨基乙基醚）-N, N, N', N'-四乙酸、甲磺酸去铁胺、二巯基丙醇、二亚乙基三胺五乙酸、反-1, 2-二胺基环己烷-N, N, N', N'-四乙酸这样的铁螯合物，柠檬酸铁螯合物，硫酸亚铁螯合物等铁螯合物）、抗氧化剂（例如还原型谷胱甘肽、抗坏血酸-2-磷酸盐）、胰岛素或胰岛素替代物（例如氯化锌、硝酸锌、溴化锌、硫酸锌等含锌化合物）、胶原前体（例如 L-脯氨酸、L-羟(基)

脯氨酸、抗坏血酸)和微量元素(例如 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br^- 、 I^- 、 Mn^{2+} 、 F^- 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、 Zr^{4+})。

其中,血清替代物的一个例子,在特表 2001-508302 号公报中作为
5 “无血清真核生物体细胞培养培养基补充物”而被详述,可以参考该公报的记载而适当确定血清替代物的组成。代表性的血清替代物作为胚胎干细胞血清替代(KSR)而由 Invitrogen 公司出售,可以容易地得到。

上述 LIF、2-ME 和 KSR 在培养培养基中,分别以 1~10000 单位/ml、
1~1000 μm 和 0.5~90% (v/v) 的终浓度、优选 100~1000 单位/ml、10~
10 100 μm 和 5~20% (v/v) 的终浓度的量使用。本发明的组合物和这些各加入成份,相对培养基既可以从最开始以成为目标终浓度的量进行添加,也可以分 2 次或其以上的次数进行添加而使用最终成为目标浓度的量。培养培养基通常用碳酸氢盐将 pH 调节为 7.0~8.2、优选为 7.3~7.9 而被使用。

本发明的组合物和培养培养基可以被分别调制成溶液形式或干燥形式。
15 在溶液形式的情况下,可以作为浓缩组合物(例如 $1\times\sim 1000\times$)提供,在使用时也可以被适当稀释。在稀释或者溶解溶液形式或干燥形式的组合物或培养培养基中使用的液体的种类,有水、缓冲水溶液、生理盐水等,可以根据需要容易地选择。

优选对本发明的组合物或培养培养基进行灭菌以防止污染。灭菌方法
20 有紫外线照射、加热灭菌、放射线照射和过滤等。

根据本发明,在培养多能干细胞且持续保持分化能的同时,进行未分化增殖,由此可以使用在上述的本发明的培养培养基、优选细胞培养用最低限量培养基中含有白血病抑制因子、抗氧化剂、血清替代物和本发明组合物而产生的培养基,在该领域所采用的通常的培养条件下培养多能干细胞。
25 胞。

多能干细胞可以使用来源于包括人、猴、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、牛、猪、狗、猫、山羊、羊的哺乳类、鸟类、爬行类等多种动物的多能干细胞,但通常是来源于哺乳动物的多能干细胞。作为多能干细胞的具体例子,可以列举 ES 细胞、EG 细胞、EC 细胞、APS 细胞、MAP 等。被
30 频繁使用的典型例子是小鼠的 ES 细胞。对培养的多能干细胞的数目没有

特别的限制，但本发明的培养方法，特别在可以培养1个多能干细胞而使之增殖并形成克隆细胞团成这一点上是有利的。

应该培养的多能干细胞其自身可以是喂养细胞依赖性的细胞，但优选喂养细胞非依赖性的细胞。为了使喂养细胞依赖性多能干细胞变为喂养细胞非依赖性，可以进行如下处理。即，在不使用喂养细胞的培养条件下，
5 进行几次传代培养，选择适合这样的条件的细胞。

在本发明的多能干细胞的培养方法中的具体操作，包括培养条件，能够按照该技术领域中常规操作和条件而进行。可以参考例如中辻宪夫：实验医学分册 后基因组时代的实验讲座4“干细胞、克隆研究方案”、羊土社（2001年）、Hogan, G.等编：小鼠胚的操作：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY（1994）、Robertson, E. J.编：畸胎瘤和胚胎干细胞、A Practical Approach, IRL Press Oxford, UK（1987）等的记载并适当确定。
10

如果举出代表性的传代操作和培养条件，有如下所示。即，为了传代培养ES细胞，首先用磷酸缓冲化生理盐水(phosphate buffered saline: PBS)对发育的ES细胞集落冲洗1~2次，然后加入足量的胰蛋白酶-EDTA溶液（0.25%胰蛋白酶-1mMEDTA、PBS中）直至覆盖细胞层，放置5分钟。然后，加入含有胰蛋白酶抑制剂的PBS或含有血清的ES细胞培养用基础培养液（CCMM+LIF+2-ME），通过移液操作分离细胞团。通过
15 普通离心分离从该细胞悬液沉淀出细胞。除去上清后，用含有血清或血清替代物的ES细胞培养用基础培养液使沉淀的细胞再次悬浮，将其中的一部分接种到喂养细胞层或明胶化的塑料培养板内，在37℃、5%CO₂的条件下培养。
20

作为本发明方法的一个实施方式，用0.1%（w/v）明胶溶液处理，在明胶化的塑料培养板内放入加热至37℃的本发明的培养培养基，向其中每1cm²培养板面积中接种10~1000个多能干细胞。将培养板放置到CO₂孵箱内，在37℃、5%CO₂的条件下培养。如果集落发育（例如E14tg2a细胞是在7日以内），换新的培养基，传代。在传代时，优选使用含有胰蛋白酶抑制剂的PBS。
25

与通过邻近的多能干细胞之间的相互作用来诱导该多能干细胞的未
30

分化增殖相比,更低密度的接种条件是,具体地讲,将1个细胞/mm²以下的接种条件等作为适当的例子表示。当建立均匀的多能干细胞和使进行遗传操作的多能干细胞增殖时,从1个多能干细胞得到其克隆细胞团的工序等当然适合在该条件下进行。

5 由于在本发明的优选实施方式中不使用喂养细胞或血清,可以省去在通常的培养方法中进行的血清批号筛选、喂养细胞的选择和培养。另外,当使用通过本发明的成份明确的培养培养基时,在涂有明胶的培养板上且在低密度接种条件下,可以以未分化状态使单一的喂养细胞非依赖性多能干细胞增殖。

10 而且,本发明还提供通过添加到不含喂养细胞和血清的细胞培养培养基中而可以使多能干细胞未分化增殖的物质的筛选方法。即,使用向细胞培养用最低限量培养基中添加白血病抑制因子、血清替代物、抗氧化剂和候补物质而产生的培养培养基,培养喂养细胞非依赖性的多能干细胞(例如,小鼠的ES细胞),确认是否产生该多能干细胞的未分化集落,通过
15 本发明选择显示显著阳性的物质。

未分化集落的形成可以使用例如含有Leishman染色的蛋白质染色来进行形态学确认。另外,也可以用抗体确认碱性磷酸酶、SSEA-1, 3, 4抗原等未分化细胞标记的存在。另外,由于Oct-3/4基因和Rex-1基因的表达对于未分化细胞也是特征性的,所以也可以作为确认手段被采用。

20 通常,多个组合这些方法来确认未分化状态。

实施上述筛选法时的标准培养培养基的组成和培养条件如下所述。

标准培养培养基的组成:

GMEM、10%KSR、10μM2-ME、1000U/ml LIF、0.1mM 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠

25 接种到培养基中的多能干细胞的数目:

每1cm²培养面积中使用1ml培养液,接种100个。

培养条件: 37℃、5%CO₂

确认和观察方法:

7日后观察培养基,通过多能干细胞的未分化集落的数目(/1cm²),
30 进行如下所述的判断:

未分化集落的数目 (/cm ²)	判断
0	—
1~5	+1
6~10	+2
10 以上	+3

通过本发明的培养方法，可以培养 1 个多能干细胞使之增殖并形成克隆细胞团。这在需要已改变基因组的多能干细胞的团的情况下，例如生成转基因动物的情况下是有利的。

5 作为用于培养是多能干细胞的代表例子即 ES 细胞的培养基，过去使用的是在细胞培养用最低限量培养基中添加（1）白血病抑制因子、（2）血清、（3）2-巯基乙醇、（4）喂养细胞的培养基。但是，在含有（1）～（3）的情况下，（4）的存在不是必须的，在涂有明胶的培养板上直接附着喂养细胞非依赖性 ES 细胞而培养也是可能的。另外，在以（4）的存在
10 为前提的情况下，可以用（5）血清替代物代替（2），不使用血清本身培养 ES 细胞成为可能。对于这样的不使用血清的培养基，本发明通过进一步添加（6）腺苷酸环化酶活性抑制物质，在不存在（4）喂养细胞的条件下使培养 ES 细胞成为可能。

15 以上是本发明对“抑制腺苷酸环化酶活性的条件”，以向培养基添加或配合腺苷酸环化酶活性抑制物质的情况为例进行了说明，但也可以用其它适当的方法制造这样的条件。例如，也可以采用抑制多能干细胞中的腺苷酸环化酶基因的表达的方法（例如使用 mRNA 和 RNAi）和用基因操作使抑制腺苷酸环化酶活性的分子表达的方法（例如使用拮抗型变异体）。

20 本发明的另一个方案提供了至少含有 1 种腺苷酸环化酶活性抑制物质的多能干细胞培养用的培养基补充物。腺苷酸环化酶活性抑制物质优选从 SQ22536（9-（四氢-2-呋喃基）-腺嘌呤）、2'，5'-二脱氧腺苷、9-环戊基腺嘌呤、2'，5'-二脱氧腺苷 3'-二磷酸、2'，5'-二脱氧腺苷 3'-一磷酸和 MDL-12330A（顺-N-（2-苯基环戊基）氮杂环十三碳-1-烯-2-胺）组成的组中选择，或从促肾上腺皮质激素
25 （ACTH）、脑钠利尿肽（BNP）和下垂体细胞腺苷酸环化酶活化肽

(PACAP) 及实质上具有与它们相同的生理活性的肽中进行选择。

本发明的另外一个方案提供了含有上述培养基补充物的多能干细胞培养用的培养基。该培养基优选不含有喂养细胞和/或血清，更优选不含有喂养细胞和血清。该培养基可以将细胞培养用最低限量培养基作为基础培养基。该培养基还可以含有分化抑制因子、血清替代物和抗氧化剂。

本发明的另一个方案提供一种多能干细胞的培养方法，其特征在于，当培养多能干细胞使未分化多能干细胞增殖时，在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下进行该培养。本方法中抑制腺苷酸环化酶活性的条件可以是伴随使用腺苷酸环化酶活性抑制物质。另外，该培养可以在上述培养基中进行。在本方法中，可以培养 1 个多能干细胞得到其克隆细胞团，另外，可以在没有喂养细胞和/或血清且没有上述培养基补充物的条件下，在上述培养基中培养未出现未分化增殖的多能干细胞并得到其克隆团。优选通过本方法在上述培养基中培养 1 个多能干细胞而得到其克隆团。在本方法中，多能干细胞可以为 ES 细胞，另外，多能干细胞可以源于哺乳动物。进而，多能干细胞也可以源于人。

本发明的另外一个方案提供用上述培养方法使之增殖并保持多能性的未分化多能干细胞。

本发明的另一个方案一种多能干细胞的培养方法，其特征在于，在培养多能干细胞建立未分化多能干细胞时，在抑制腺苷酸环化酶活性的条件下进行该培养。本方法中抑制腺苷酸环化酶活性的条件可以是伴随使用腺苷酸环化酶活性抑制物质。另外，该培养可以在上述培养基中进行。本方法中多能干细胞可以为 ES 细胞，另外，多能干细胞可以源于哺乳动物。进而，多能干细胞也可以源于人。

本发明的另外一个方案提供用上述培养方法建立的保持多能性的未分化多能干细胞。

以下的实施例证明通过不使用这样的血清和喂养培养基且全部用明确的成份调制而成的培养基来培养 ES 细胞是可能的。本发明并不限于这些实施例。

30 实施例 1

作为细胞培养最低限量培养基，使用 Glasgow 最低必需培养基（Glasgow minimum essential medium: GMEM; Sigma 公司），通过在其
中添加了（1） $1 \times 10^3 \text{ U/ml}$ LIF（ESGRO, Invitrogen 公司）、（3） $0.1 \mu\text{M}$
M2-巯基乙醇（ナカライテスク社）、（5）10%（v/v）KSR（Invitrogen
5 公司）的培养液 1ml，在用 0.1%（w/v）明胶溶液处理后明胶化的 12 孔板的
1 孔内，在 37°C 、5% CO_2 条件下培养 100 个喂养细胞非依赖性 ES 细胞
（E14tg2a（Hooper, M. et al., Nature, 325, 292（1987））、CGR8（Mountford,
P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4303（1994））和从这些细胞衍生
的 ES 细胞。

10 培养 5 天以后，吸出培养液后添加覆盖板面的量的 Leischman 染色液
（1.5g Leischman 染色: Sigma 公司/L 甲醇），室温下保持 10 分钟，水洗
（Leischman 染色）。用肉眼或光学显微镜观察染蓝的集落，结果完全没
有看到形态上维持未分化状态的集落的形成（图 1（g））。如果在该组成
的培养液中进一步添加（2）0.3%（v/v）FCS 进行培养，就会看到平均 17
15 个的未分化集落的形成（图 1（d））。从这些结果考虑到，通过（1）+
（3）+（5）的组成，缺乏（2）FCS 中含有的未分化集落形成所必需的
成份。另外，如果用同样的培养液组成（（1）+（3）+（5））培养每
孔 1000 个以上的 ES 细胞，就会看到未分化集落的形成。如果以终浓度
10%（v/v）向培养液添加该高密度培养上清（conditioned medium: CM）
20 培养每孔 100 个 ES 细胞，就会看到平均 7 个的未分化集落的形成（图 1
（f））。这表明 ES 细胞本身分泌未分化集落形成所必需的成份。

然后，将从各种已知生长因子、细胞因子、肽激素等选择的候补肽添
加到含（1）+（3）+（5）的培养基中，在 37°C 、5% CO_2 条件下培养
ES 细胞，观察其未分化集落形成能力。其结果，在添加了 $1 \mu\text{M}$ 促肾上腺
25 皮质激素、 $1 \mu\text{M}$ 脑钠利尿肽和 $1 \mu\text{M}$ 下垂体细胞腺苷酸环化酶活化肽的
培养基中，看到形态上清楚的 ES 细胞的未分化集落的形成（图 1（e）；
使用 ACTH 作为肽）。其中，图 1（a）～（c）表示向 GMEM、LIF 和 2
-ME 构成的培养基中分别添加 FCS+喂养细胞、KSR+喂养细胞和 FCS
的情况。

30 通过这些肽激素的补充形成未分化集落的 ES 细胞，在作为未分化状

态标记的碱性磷酸梅活性染色试验中为阳性（图 1），通过采用相同基因重组法导入的报告基因的活性，也可以确认未分化细胞特异表达的转录因子 Oct-3/4 的表达。因而，这些肽被认为像 FCS 和 CM 那样具有未分化集落形成喂养能力。

5

实施例 2

在上述实施例 1 中，使用在试验的候补肽当中以最低浓度显示活性的 ACTH 和其片段，验证了其显著性。同上述一样，在向细胞培养最低限量培养基中已添加（1）LIF、（3）2-ME 和（5）KSR 的培养培养基中，
10 当以终浓度 $1\mu\text{M}$ 添加 ACTH 或其片段时，ACTH（1-39）、ACTH（1-24）、ACTH（11-24）显示了活性，而 ACTH（18-39）没有显示活性。另外，在显示活性的 ACTH 或其片段中，ACTH（1-24）显示的活性最强，即使用以终浓度 $0.1\mu\text{M}$ 也喂养未分化集落形成。另外，在已添加 $10\mu\text{M}$ 的 ACTH（1-24）的条件下的未分化集落形成率与细胞增殖速度，
15 与添加 0.3%FCS 或 10%CM 时是同等的。

从以上结果可以认为，向作为基础培养基的细胞培养最低限量培养基中添加（1）LIF、（3）2-ME、（5）KSR+（6）ACTH 等的肽激素得到的培养基，即使不含血清或喂养细胞，也可以在维持多能性的未分化状态下使 ES 细胞增殖。

20

实施例 3

为了弄清 ACTH 在细胞内传递哪个信号的结果是否使 ES 细胞在没有血清或喂养细胞的存在下且维持多能性的未分化状态下增殖，向培养基添加各种信号传递抑制因子，观察 ES 细胞的增殖。

25 已知 ACTH 使属于 G 蛋白质偶联受体家族的 ACTH 受体活化，ACTH 受体借助含有 G_{α_s} 亚单位的三聚体 G 蛋白质的活化而使腺苷酸环化酶活化。因此，向已添加了（1） $1\times 10^3\text{U/ml}$ LIF、（3） $0.1\mu\text{M}$ 2-ME、（5）10%（v/v）KSR 和（6） $10\mu\text{M}$ ACTH 的细胞培养最低限量培养基中，进一步添加作为腺苷酸环化酶抑制剂的（7）SQ22536（9-（四氢-2-呋喃基）-腺嘌呤）（Sigma） $100\mu\text{M}$ ，使用该培养基与实施例 1 同样地培养
30

ES 细胞。其结果，与预想相反，培养第 7 天的未分化集落的形成完全不被抑制，各个集落反而显著变大。

为了检验 SQ22536 单独的效果，使用已添加了 (1) $1 \times 10^3 \text{U/ml}$ LIF、
(3) $0.1 \mu\text{M}$ 2-ME、(5) 10% (v/v) KSR 和 (7) SQ22536 $100 \mu\text{M}$ 的细胞培养最低限量培养基，与实施例 1 同样地培养 ES 细胞。其结果，
与加入了 ACTH 的情况一样，看到了平均 9 个未分化集落的形成。另外，
即使使用已添加了其它作为腺苷酸环化酶抑制剂的 2', 5' - 二脱氧腺苷
(Sigma) $500 \mu\text{M}$ 来代替 SQ22536 的培养基，也会看到平均 8 个未分化
集落的形成。这些结果表明了腺苷酸环化酶活性的抑制导致未分化集落的
形成。

通过 G 蛋白质偶联型受体的腺苷酸环化酶的抑制，通常是借助含有 G_{α_i} 亚单位的三聚体 G 蛋白质的活化而引起的。为了确认 ACTH 的效果是否是借助该信号传递通路产生的，在含有 (1) $1 \times 10^3 \text{U/ml}$ LIF、(3) $0.1 \mu\text{M}$ 2-ME、(5) 10% (v/v) KSR 和 (6) $10 \mu\text{M}$ ACTH 的细胞培养最低
限量培养基中，以终浓度为 100ng/ml 添加作为 G_{α_i} 抑制剂的百日咳毒素，
使用该培养基，与实施例 1 同样地培养 ES 细胞。其结果，ACTH 的效果
被抑制，未分化集落的大小显著减小。这些结果表明，ACTH 的未分化集
落形成喂养效果借助 G_{α_i} 的活化。另外，由于 ACTH 受体与 G_{α_s} 偶联，所
以暗示了在 ES 细胞中，ACTH 是与和其特异性受体不同的 G 蛋白质偶联
型受体结合。

从以上结果可判断，通过 ACTH 的未分化集落形成喂养作用是通过以下的信号传递通路引起的。①在与 G_{α_i} 偶联的 G 蛋白质偶联型受体上结合 ACTH，②活化 G_{α_i} ，接着③抑制腺苷酸环化酶的活性。因而，为了在不
含血清和喂养细胞的培养基中使 ES 细胞在未分化的状态下增殖，只要是
抑制腺苷酸环化酶的活性的方法，可以采用任何方法。

实施例 4

在上述实施例 1 中，将使用 1nM 促肾上腺皮质激素进行培养得到的
源于未分化集落的 ES 细胞，再传代 2 次之后，将它们注入小鼠的胚胎中
并移植到假妊娠雌小鼠的子宫中。其结果，从 100 个移植胚得到 33 只出

生鼠，30只在生后3周以后仍存活，而其中有17只是显示出在毛色上70%以上的ES细胞供给率（contribution ratio）的良好嵌合体小鼠。另外，在17只中有14只是公鼠，所谓的雄性畸变（male distortion）得到确认，通过它们的交配实验，ES细胞向生殖细胞系的供给得到确认。这些事实
5 证明了本培养条件对于维持ES细胞的多能性是足够的。

实施例5

提取C57BL/6纯系小鼠受精后3.5天的胚泡期的胚30个，在分别涂有粘连蛋白的培养板内，用由CCMM、（1） 1×10^3 U/ml LIF、（3） 0.1
10 μ M 2-ME、 0.1 mM 非必需氨基酸、 1 mM 丙酮酸钠、（5）10%（v/v）KSR和（6） 10μ M ACTH构成的培养液，培养通过免疫手术法从上述胚中分离出的内细胞团。其结果，至少2个内细胞团开始增殖，并最终达到作为ES细胞株而建立。由此证明了该培养法不仅对已经建立的ES细胞的培养，而且对新的ES细胞株的建立都是有用的。

15

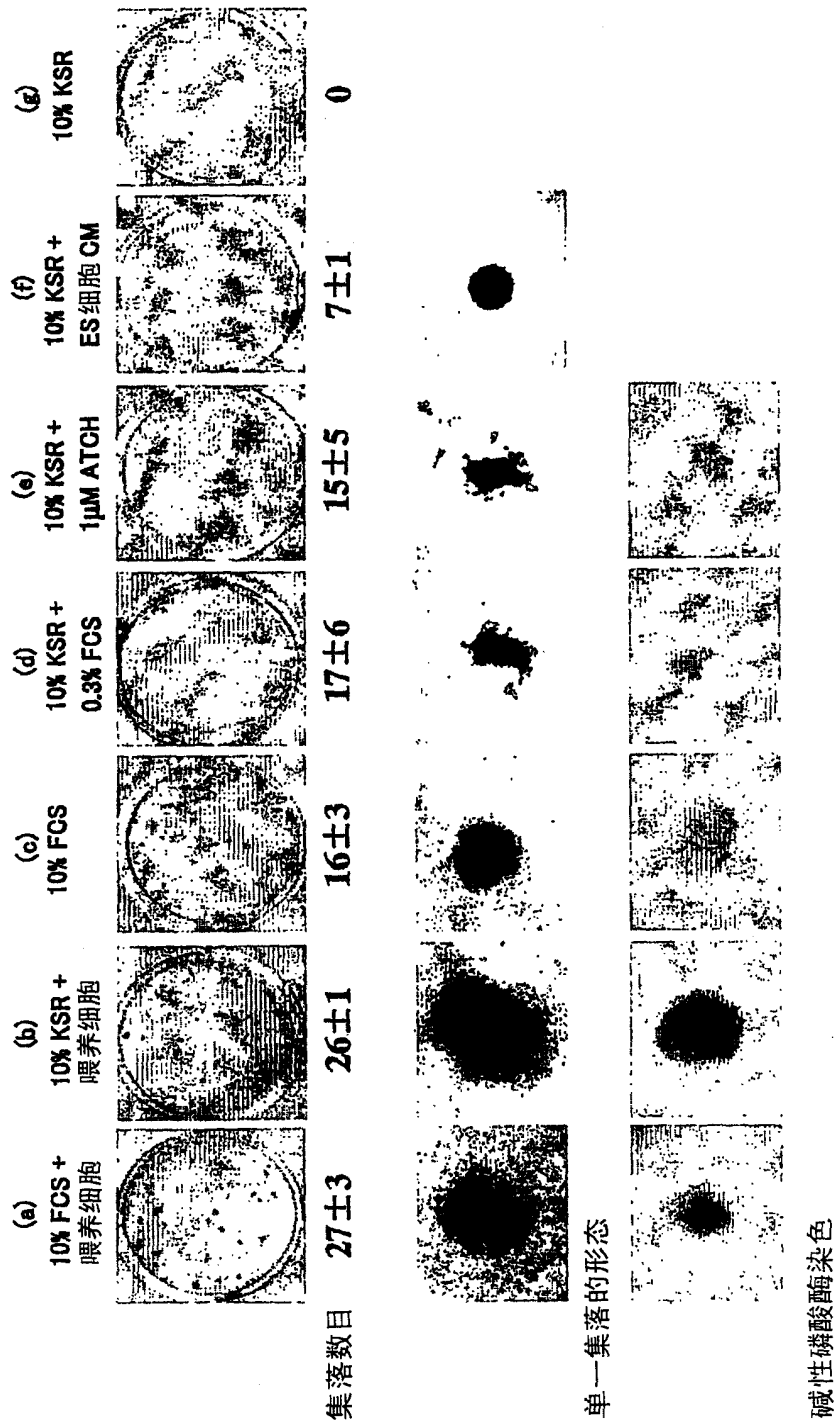


图 1