

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/064715

発行日 平成29年3月9日(2017.3.9)

(43) 国際公開日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/076 (2010.01)	C 1 2 N 5/076	4 C O 8 7
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 H O 4 5
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

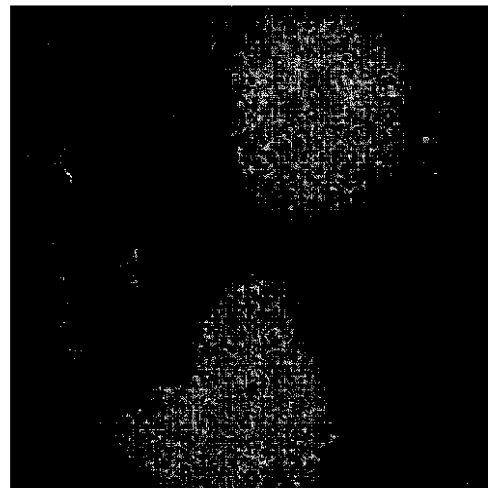
出願番号	特願2015-545309 (P2015-545309)	(71) 出願人	000003034
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/078964		東亜合成株式会社
(22) 国際出願日	平成26年10月30日(2014.10.30)		東京都港区西新橋1丁目14番1号
(31) 優先権主張番号	特願2013-225922 (P2013-225922)	(71) 出願人	504132272
(32) 優先日	平成25年10月30日(2013.10.30)		国立大学法人京都大学
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
		(74) 代理人	100117606
			弁理士 安部 誠
		(74) 代理人	100136423
			弁理士 大井 道子
		(72) 発明者	吉田 徹彦
			日本国茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ゲノム不安定な i P S 細胞の除去方法および該方法に用いられる合成ペプチド

(57) 【要約】

多能性幹細胞のゲノム安定性を高効率かつ高い信頼性で評価し得る方法と、該評価方法によりゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を評価対象とする多能性幹細胞の培養物中から除去する方法と、これら方法に利用可能な合成ペプチドを提供する。

本発明によって提供される方法は、対象とする多能性幹細胞の培養物を準備し、当該培養物中の多能性幹細胞のカルレティキュリンの発現量を調べ、該カルレティキュリンの発現量の程度に基づいて該幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別することを包含する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象となるヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法であって、

前記多能性幹細胞の培養物を準備すること、および

該培養物中の多能性幹細胞についてカルレティキュリンの発現量を調べ、該カルレティキュリンの発現量の程度に基づいて該多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性を判別すること、

を包含し、

ここで、前記判別において、カルレティキュリン発現量が所定レベルを上回った多能性幹細胞をゲノム不安定性であると判別する、評価方法。

10

【請求項 2】

前記カルレティキュリンの発現量の程度に基づいた多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性の判別は、カルレティキュリン又はその断片と特異的に反応する抗体を用いた免疫学的手法で行う、請求項 1 に記載の評価方法。

【請求項 3】

前記判別の前に、前記対象の多能性幹細胞培養物中に以下のアミノ酸配列：

C R A K A G D P C (配列番号 1)；および

C E Q K Q E I R C (配列番号 2)；

のうちのいずれか若しくは該アミノ酸配列において 1 個、又は 2 個、又は 3 個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変アミノ酸配列のいずれかからなるカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列を含む合成ペプチドを少なくとも 1 回供給することをさらに含み、該合成ペプチドを少なくとも一回供給した当該多能性幹細胞培養物を所定時間培養した後に前記判別を行うことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の評価方法

20

【請求項 4】

前記改変アミノ酸配列は、配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列の N 末端及び C 末端のシステイン残基(C)を欠失したものである、請求項 3 に記載の評価方法。

【請求項 5】

前記合成ペプチドは、前記カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列の N 末端側若しくは C 末端側に膜透過性ペプチド配列を有する、請求項 3 又は 4 に記載の評価方法。

30

【請求項 6】

前記合成ペプチドは、前記膜透過性ペプチド配列として、以下のアミノ酸配列：

K K R T L R K N D R K K R (配列番号 5)；

を有する、請求項 5 に記載の評価方法。

【請求項 7】

前記合成ペプチドを構成する全アミノ酸残基数が 30 以下である、請求項 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の評価方法。

【請求項 8】

前記合成ペプチドは、以下のアミノ酸配列：

40

K K R T L R K N D R K K R G G C R A K A G D P C (配列番号 10)；

K K R T L R K N D R K K R G G C E Q K Q E I R C (配列番号 11)；

K K R T L R K N D R K K R G G R A K A G D P (配列番号 12)；および

K K R T L R K N D R K K R G G E Q K Q E I R (配列番号 13)；

のうちのいずれかを有する、請求項 7 に記載の評価方法。

【請求項 9】

対象となるヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞を含む培養物中からゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法であって、

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の評価方法によって該培養物中の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性を判別すること、および

50

該判別方法によりゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を該培養物中から除去すること、
を包含する、除去方法。

【請求項 10】

前記ゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を、細胞選別機（セルソーター）を使用して除去する、請求項 9 に記載の除去方法。

【請求項 11】

前記ゲノム不安定な多能性幹細胞が、染色体異常を有する多能性幹細胞である、請求項 9 又は 10 に記載の除去方法。

【請求項 12】

ヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞を含む培養物を製造する方法であって、
該多能性幹細胞の培養過程において、請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の除去方法によってゲノム不安定な多能性幹細胞を該多能性幹細胞の培養物中から除去することを包含する、製造方法。

【請求項 13】

ゲノム不安定な多能性幹細胞に対してカルレティキュリン発現誘導活性を奏する人為的に合成されたペプチドであって、以下のアミノ酸配列：

C R A K A G D P C（配列番号 1）；および

C E Q K Q E I R C（配列番号 2）；

のうちのいずれか若しくは該アミノ酸配列において 1 個、又は 2 個、又は 3 個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成されたアミノ酸配列のいずれかからなるカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列を含む合成ペプチド。

【請求項 14】

前記改変アミノ酸配列は、配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列の N 末端及び C 末端のシステイン残基（C）を欠失したものである、請求項 13 に記載の合成ペプチド。

【請求項 15】

前記カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列の N 末端側若しくは C 末端側に膜透過性ペプチド配列を有する、請求項 13 又は 14 に記載の合成ペプチド。

【請求項 16】

前記膜透過性ペプチド配列として、以下のアミノ酸配列：

K K R T L R K N D R K K R（配列番号 5）；

を有する、請求項 15 に記載の合成ペプチド。

【請求項 17】

前記合成ペプチドを構成する全アミノ酸残基数が 30 以下である、請求項 13 ～ 16 のいずれか一項に記載の合成ペプチド。

【請求項 18】

以下のアミノ酸配列：

K K R T L R K N D R K K R G G C R A K A G D P C（配列番号 10）；

K K R T L R K N D R K K R G G C E Q K Q E I R C（配列番号 11）；

K K R T L R K N D R K K R G G R A K A G D P（配列番号 12）；および

K K R T L R K N D R K K R G G E Q K Q E I R（配列番号 13）；

のうちのいずれかを有する、請求項 17 に記載の合成ペプチド。

【請求項 19】

ゲノム不安定な多能性幹細胞のカルレティキュリン発現量を増大するために用いられるカルレティキュリン発現誘導剤であって、請求項 13 ～ 18 のいずれか一項に記載の合成ペプチドを含む、カルレティキュリン発現誘導剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell ; 以下「E S 細胞」ともいう)、誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; 以下「i P S 細胞」ともいう) 等の多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法と該方法に用いる合成ペプチドに関する。また、多能性幹細胞を含む培養物中からゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法に関する。

なお、本出願は 2013 年 10 月 30 日に出願された日本国特許出願 2013 - 225922 号に基づく優先権を主張しており、当該日本国出願の全内容は本明細書中に参照として援用されている。

【背景技術】

【0002】

ヒト又はヒト以外の哺乳動物由来の多能性幹細胞 (典型的には i P S 細胞、E S 細胞) を再生医療 (典型的には移植医療) に応用する際の一つの課題として、医療に利用可能な当該幹細胞を高効率に生産する技術の確立が挙げられる。

例えば、ゲノム不安定な i P S 細胞等の多能性幹細胞は生体内への移植に不適なため、再生医療に利用可能な i P S 細胞等の多能性幹細胞を得るためには対象の多能性幹細胞集団の中からゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する必要がある。上記ゲノム不安定な多能性幹細胞の除去に際しては、当然、多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する必要がある。

【0003】

しかしながら、現在までに報告されている多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法 (例えば、染色体分染法や蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (Fluorescence in situ hybridization : F I S H) 法等) は、煩雑な操作が必要であったり、或いは熟練の技術を要するものであった。そのため、より簡便で高効率に多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法が求められている。また、従来の評価方法の多くは対象細胞の固定を必要とするため、実際に再生医療に用いる多能性幹細胞 (即ち生きた状態の該細胞) 自身のゲノム安定性を直接評価することが困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】国際公開第 W O 2009 / 093692 号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】セル・サイクル (Cell Cycle)、8 巻 (6 号)、2009 年、p p . 860 - 869

【非特許文献 2】キャンサー・リサーチ (Cancer Research)、67 巻 (17 号)、2007 年、p p . 7941 - 7944

【非特許文献 3】カレント・バイオロジー (Current Biology)、12 巻、2002 年、p p . 1287 - 1292

【発明の概要】

【0006】

そこで本発明は、かかる多能性幹細胞の利用に関する従来の課題を解決するべく創出されたものであり、多能性幹細胞のゲノム安定性を高効率且つ高い信頼性で評価し得る方法を提供する。また、上記評価方法によりゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞の培養物中から除去する方法を提供する。さらに、上記評価方法および上記除去方法の効果を高めるために利用可能な、人為的に合成可能な比較的短い鎖長のペプチドの提供を他の目的とする。また、そのようなペプチドを含む組成物の提供を他の目的とする。

【0007】

本発明者は、正常な細胞においては細胞内 (典型的には小胞体内) にその局在が確認される一方で、がん細胞や病原体に感染した細胞においては免疫原性の細胞死を起こす際に該細胞の表面に発現誘導される免疫賦活性タンパク質 (いわゆるイートミーシグナル、eat-me signal) として知られるカルレティキュリンタンパク質 (Calreticulin、以下「カ

10

20

30

40

50

ルレティキュリン」ともいう)に着目した(非特許文献1、2)。

そして、種々の多能性幹細胞におけるカルレティキュリンの発現量を調べたところ、驚くべきことに、ゲノム不安定な多能性幹細胞(例えばiPS細胞)はゲノム安定な同種の幹細胞と比較してカルレティキュリンの発現量が顕著に増大していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

上記の目的を実現すべく、本発明によると、対象となるヒト又は他の哺乳動物由来のiPS細胞等の多能性幹細胞の培養物を準備することと、該培養物中の多能性幹細胞についてカルレティキュリンの発現量(対象とする多能性幹細胞の細胞表面(典型的には細胞膜の表面)に発現するカルレティキュリンの存在量)を調べ、該カルレティキュリンの発現量の程度に基づいて該多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性を判別することと、を包含する多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法(ゲノム安定性評価方法)を提供する。そして、ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法は、上記判別において、カルレティキュリン発現量が所定レベルを上回った多能性幹細胞をゲノム不安定性であると判別することを特徴とする。

10

【0009】

ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法を用いると、多能性幹細胞培養物中(典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES細胞培養物中)の多能性幹細胞のカルレティキュリンの発現量を調べるという簡便な操作によって、該幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別することができる。したがって、簡便且つ高効率にiPS細胞等の多能性幹細胞のゲノム安定性を評価することが可能である。このようなゲノム安定性評価方法は、多量の多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する場合(例えば、iPS細胞のクローン確立や再生医療に資するiPS細胞の準備等)に特に好適に利用できる。

20

【0010】

ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法の好ましい一態様は、上記カルレティキュリンの発現量に基づいた多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性の判別を、カルレティキュリン又はその断片と特異的に反応する抗体(即ち、抗カルレティキュリン抗体)を用いた免疫学的手法で行うことを特徴とする。

抗カルレティキュリン抗体を用いた免疫学的手法によると、対象の多能性幹細胞培養物中(典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES細胞培養物中)の多能性幹細胞におけるカルレティキュリンの発現を、特異的かつ高感度に調べることができる。したがって、iPS細胞等の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を高精度且つ高い信頼性をもって判別することが可能となる。また、免疫学的手法を用いた多能性幹細胞のゲノム安定性の評価は、従来のゲノム安定性を評価する方法(例えばFISH法)と比較して短時間かつ簡便な操作でiPS細胞等の多能性幹細胞のゲノム安定性を評価し得るため好ましい。

30

【0011】

また本発明者は、上記多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法の効果を高めるため、ゲノム不安定な多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞若しくはES細胞)において特にカルレティキュリンの発現量を増大させる物質を模索した。鋭意検討の結果、本発明者は、ヒト由来のセントリン2(centrin 2、中心体関連タンパク質)のsiRNA(small interfering RNA、低分子干渉RNA)を構成するRNA配列から翻訳されるアミノ酸配列を設計し、当該アミノ酸配列を含むように作製した合成ペプチドが、対象の多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞等の多能性幹細胞培養物の培地中)に供給された際にゲノム不安定な多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞)において特にカルレティキュリン発現量を増大し得る或いはカルレティキュリンの発現を誘導し得る能力(カルレティキュリン発現誘導活性)を有することを見出した。

40

本発明者は上記知見に基づき、本発明の他の側面として、ゲノム不安定な多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞若しくはES細胞)に対してカルレティキュリン発現誘導活性を奏する人為的に合成されたペプチド(以下、「カルレティキュリン発現誘導ペプチド」と

50

いう)を完成するに至った。

具体的には、本発明者は、以下のアミノ酸配列：

C R A K A G D P C (配列番号1)；および

C E Q K Q E I R C (配列番号2)；

のうちのいずれか若しくは該アミノ酸配列において1個又は数個(典型的には2個又は3個)のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されて形成された改変アミノ酸配列のいずれかからなるカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列を含む合成ペプチドを提供する。

【0012】

ここで開示される合成ペプチドは、化学合成(若しくは生合成)によって容易に人為的に製造することができる。また、物質自体が単純な構造(直鎖状のペプチド鎖)であるため、取扱いが容易であり、例えば、iPS細胞等の多能性幹細胞(典型的には当該幹細胞培養物の培地中)に該カルレティキュリン発現誘導ペプチドを供給するという簡易な処理を行うことによって、ゲノム不安定な多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞)のカルレティキュリン発現量を増大させることができる。

10

【0013】

また、本発明によると、ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法の好ましい一態様として、上記カルレティキュリンの発現量の程度に基づいて多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性の判別を行うより前に、ここで開示される少なくとも1種のカルレティキュリン発現誘導ペプチドを対象の多能性幹細胞培養物中に少なくとも1回供給することをさらに含み、該合成ペプチドを少なくとも一回供給した当該多能性幹細胞培養物を所定時間培養した後に上記判別を行うことを特徴とする評価方法が提供される。

20

【0014】

上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドを用いてゲノム不安定な多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞若しくはES細胞)におけるカルレティキュリン発現量を増大させることで、ゲノム不安定な多能性幹細胞とゲノム安定な多能性幹細胞とのカルレティキュリン発現量の差を明確にすることができる。これにより、カルレティキュリンの発現の程度に基づいてiPS細胞等の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の判別がいったん容易となるため、多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法の精度向上と信頼性向上を実現することができる。

30

【0015】

また、ここで開示される好ましい一態様のカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、上記改変アミノ酸配列が配列番号1又は2のアミノ酸配列のN末端及びC末端のシステイン残基(C)を欠失したものである。

上記改変アミノ酸配列からなるカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列もまた、配列番号1又は2に示すカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と同様に良好なカルレティキュリン発現誘導活性を発揮することができる。

【0016】

また、ここで開示される好ましい一態様のカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、上記カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列のN末端側若しくはC末端側に膜透過性ペプチド配列を有する。

40

このような膜透過性ペプチドを有する上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドは、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列を高効率にiPS細胞等の多能性幹細胞内(細胞膜及び/又は核膜の内側)に移入することができるため、本発明の実施に好適に用いることができる。

【0017】

また、ここで開示される好ましい一態様のカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、上記膜透過性ペプチド配列として、以下のアミノ酸配列：

K K R T L R K N D R K K R (配列番号5)；

を有する。

50

配列番号 5 としてここで開示されるアミノ酸配列は、膜透過性ペプチドを構成するアミノ酸配列の典型例であり、特にゲノム不安定な多能性幹細胞（典型的には i P S 細胞）におけるカルレティキュリン発現を高効率に誘導することができる。

【 0 0 1 8 】

また、ここで開示される好ましい一態様のカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、該合成ペプチドを構成する全アミノ酸残基数が 30 以下である。

このような短いペプチド鎖のペプチドは化学合成が容易であり、且つ、安価で取扱い性に優れるため、本発明の実施に特に好適に用いることができる。

【 0 0 1 9 】

また、ここで開示される好ましい一態様のカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、以下のアミノ酸配列：

K K R T L R K N D R K K R G G C R A K A G D P C （配列番号 10）；

K K R T L R K N D R K K R G G C E Q K Q E I R C （配列番号 11）；

K K R T L R K N D R K K R G G R A K A G D P （配列番号 12）；および

K K R T L R K N D R K K R G G E Q K Q E I R （配列番号 13）；

のうちのいずれかを有する。

かかる合成ペプチドは、特に、ヒト由来のゲノム不安定な i P S 細胞に対してカルレティキュリン発現誘導活性を奏する。ヒト由来の i P S 細胞を好適な適用対象とする上記合成ペプチドは、医療産業上の利用価値が極めて高い。

【 0 0 2 0 】

また、本発明によると、他の側面として、対象となるヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞を含む培養物中からゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法であって、ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法のいずれかによって対象の多能性幹細胞培養物中の多能性幹細胞のゲノム安定性の有無又はその程度を判別すること、および、該判別方法によりゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を該多能性幹細胞培養物中から除去すること、を包含する方法が提供される。

対象の多能性幹細胞培養物中（典型的には i P S 細胞培養物中若しくは E S 細胞培養物中）からゲノム不安定と判別された多能性幹細胞を除去することで、ゲノム安定と判別された多能性幹細胞を主体とする（好ましくはゲノム安定と判別された多能性幹細胞からなる）多能性幹細胞培養物（例えば i P S 細胞培養物）を作製することができる。そのため、上記ゲノム不安定な多能性幹細胞の除去方法は、再生医療に利用可能な i P S 細胞等の多能性幹細胞培養物の作製に好適に採用できる。また、上記多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法によって対象の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性を判別することにより、高効率且つ高精度にゲノム不安定な多能性幹細胞（好ましくは i P S 細胞）の除去を実現することができる。

【 0 0 2 1 】

ここで開示される好ましい一態様のゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法は、上記ゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を、細胞選別機（セルソーター）を使用して除去することの特徴とする。

細胞選別機（セルソーター）を使用することで、多能性幹細胞（典型的には i P S 細胞若しくは E S 細胞）を含む培養物中からゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を効率よく除去することができる。そのため、細胞選別機を使用したゲノム不安定な多能性幹細胞の除去方法は、特に、多量の多能性幹細胞（典型的には i P S 細胞）を含む培養物からの細胞除去に好適である。

【 0 0 2 2 】

典型的には、上記ゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法によって除去される多能性幹細胞は、染色体異常を有する多能性幹細胞である。染色体異常を有する i P S 細胞等の多能性幹細胞（或いは該幹細胞を分化誘導して得られる細胞、細胞塊、組織等）は生体内に移植された後で腫瘍の原因となる虞があるため、染色体異常を有する多能性幹細胞を除去する上記方法は、再生医療に資するための多能性幹細胞（典型的には i P S 細胞）を

準備する方法として好適に利用できる。特に、上記除去される細胞が染色体異常を有するヒト由来の i P S 細胞である上記除去方法は、本発明の好適な一実施形態である。

【 0 0 2 3 】

また、本発明によると、他の側面として、ヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞を含む培養物を製造する方法であって、該多能性幹細胞の培養過程において、ここで開示されるゲノム不安定な多能性幹細胞の除去方法のいずれかによって、ゲノム不安定な多能性幹細胞を該多能性幹細胞培養物中から除去することを包含する方法が提供される。

かかる製造方法により製造された多能性幹細胞培養物（典型的には i P S 細胞培養物若しくは E S 細胞培養物）は、上記除去方法によりゲノム不安定な多能性幹細胞が除去された多能性幹細胞培養物であるため、当該培養物中に含まれる実質的に全ての多能性幹細胞がゲノム安定な多能性幹細胞である多能性幹細胞培養物として把握され得る。該多能性幹細胞培養物（典型的には該多能性幹細胞培養物中の多能性幹細胞）は、腫瘍化のリスクが低い再生医療用多能性幹細胞として好適に利用することができる。特にヒト由来の i P S 細胞を含む培養物を製造する上記方法は、医療産業上の利用価値が極めて高いため好ましい一実施形態である。

【 0 0 2 4 】

また、本発明によると、他の側面として、ここで開示される少なくとも1種のカルレティキュリン発現誘導ペプチドを含む、ゲノム不安定な多能性幹細胞のカルレティキュリン発現量を増大するために用いられるカルレティキュリン発現誘導剤が提供される。

また、典型的には、上記カルレティキュリン発現誘導剤は、薬学上許容され得る少なくとも1種の担体（例えば上記ペプチドの安定性向上に資する少なくとも1種の基材、或いは生理食塩水や各種の緩衝液等の液状媒体）を含む。

かかるカルレティキュリン発現誘導剤は、単純な構造（直鎖状のペプチド鎖）の合成ペプチドを有効成分として含むため、例えば、i P S 細胞等の多能性幹細胞（典型的には当該幹細胞培養物の培地中）に該カルレティキュリン発現誘導剤を供給するという簡易な処理を行うことによって、ゲノム不安定な多能性幹細胞のカルレティキュリン発現量を増大させることができる。これにより、上記幹細胞におけるカルレティキュリンの発現の程度に基づいて、当該幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を高精度且つ高信頼性に判別可能となる。また、化学合成（若しくは生合成）によって容易に人為的に製造され得る合成ペプチドを有効成分として含むため、所望量のカルレティキュリン発現誘導剤を容易に調製することができる。なお、上記カルレティキュリン発現誘導剤は、特にゲノム不安定なヒト由来の i P S 細胞のカルレティキュリンの発現量を増大させるために好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 5 】

【図1】図1は、ゲノム安定なヒト i P S 細胞におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真（画像）であり、D A P I（4',6-diamidino-2-phenylindole）による核染色画像と、抗カルレティキュリン抗体を使用した免疫蛍光抗体法で調べた結果を示す蛍光画像とを重ねた（マージした）画像である。

【図2】図2は、ゲノム不安定な（具体的には、12番染色体が3倍体（トリソミー）である）細胞を含むヒト i P S 細胞培養物におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真（画像）であり、D A P Iによる核染色画像と、抗カルレティキュリン抗体を使用した免疫蛍光抗体法で調べた結果を示す蛍光画像とを重ねた（マージした）画像である。

【図3】図3は、ゲノム不安定な（具体的には、12番染色体が3倍体（トリソミー）である）細胞を含むヒト i P S 細胞の培養物中に一実施形態に係るカルレティキュリン発現誘導ペプチド（サンプル1）を培地中の濃度が10 μ Mとなるように添加して培養した後、当該 i P S 細胞におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真（画像）であり、D A P Iによる核染色画像と、抗カルレティキュリン抗体を使用した免疫蛍光抗体法で調べた結果を示す蛍光画像とを重ねた（マージした）画像である。

【図４】図４は、ゲノム安定なヒトiPS細胞に一実施形態に係るカルレティキュリン発現誘導ペプチド（サンプル１）を培地中の濃度が10μMとなるように添加して培養した後、当該iPS細胞におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真（画像）であり、DAPIによる核染色画像と、抗カルレティキュリン抗体を使用した免疫蛍光抗体法で調べた結果を示す蛍光画像とを重ねた（マージした）画像である。

【図５】図５は図２と同じ画像であり、ゲノム不安定な（具体的には、12番染色体が3倍体（トリソミー）である）細胞を含むヒトiPS細胞の培養物をカルレティキュリン発現誘導ペプチド無添加で培養した後、当該iPS細胞におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真（画像）であり、DAPIによる核染色画像と、抗カルレティキュリン抗体を使用した免疫蛍光抗体法で調べた結果を示す蛍光画像とを重ねた（マージした）画像である。

10

【図６】図６は図１と同じ画像であり、ゲノム安定なヒトiPS細胞をカルレティキュリン発現誘導ペプチド無添加で培養した後、当該iPS細胞におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真（画像）であり、DAPIによる核染色画像と、抗カルレティキュリン抗体を使用した免疫蛍光抗体法で調べた結果を示す蛍光画像とを重ねた（マージした）画像である。

【図７】図７は、ゲノム不安定な（具体的には、12番染色体が3倍体（トリソミー）である）細胞を含むヒトiPS細胞の培養物について、蛍光色素（フィコエリトリン、Phycoerythrin）で標識された抗カルレティキュリン抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、該蛍光色素（Phycoerythrin）の蛍光発色の強度をFACSを用いて分析した結果を示すヒストグラムである。横軸に蛍光強度を示し、縦軸に細胞数を示す。なお、対照試験区（ネガティブコントロール区）として、蛍光免疫染色を行っていないiPS細胞（Unstained cells）を、上記Phycoerythrinの蛍光発色強度測定と同様の条件で分析した結果を重ねて示す。

20

【図８】図８は、ゲノム安定なヒトiPS細胞について、蛍光色素（Phycoerythrin）で標識された抗カルレティキュリン抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、該蛍光色素（Phycoerythrin）の蛍光発色の強度をFACSを用いて分析した結果を示すヒストグラムである。横軸に蛍光強度を示し、縦軸に細胞数を示す。なお、対照試験区（ネガティブコントロール区）として、蛍光免疫染色を行っていないiPS細胞（Unstained cells）を、上記Phycoerythrinの蛍光発色強度測定と同様の条件で分析した結果を重ねて示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0026】

以下、本発明の好適な実施形態を説明する。本明細書において特に言及している事項（例えばここで開示される合成ペプチドの一次構造や鎖長）以外の事柄であって本発明の実施に必要な事柄（例えばペプチドの化学合成法、細胞培養技法、ペプチドを成分とする薬学的組成物の調製に関する一般的な事項）は、細胞工学、生理学、医学、薬学、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、遺伝学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。本発明は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。なお、以下の説明では、場合に応じてアミノ酸をIUPAC-IUBガイドラインで示されたアミノ酸に関する命名法に準拠した1文字表記（但し配列表では3文字表記）で表す。

40

また、本明細書中で引用されている全ての文献の全ての内容は本明細書中に参照として組み入れられている。

【0027】

また、本明細書において「合成ペプチド」とは、そのペプチド鎖がそれのみ独立して自然界に安定的に存在するものではなく、人為的な化学合成或いは生合成（即ち遺伝子工学に基づく生産）によって製造され、所定の組成物（例えばカルレティキュリン発現誘導剤）中で安定して存在し得るペプチド断片をいう。

また、本明細書において「ペプチド」とは、複数のペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーを指す用語であり、ペプチド鎖に含まれるアミノ酸残基の数によって限定されないが

50

、典型的には全アミノ酸残基数が概ね 100 以下（好ましくは 60 以下、例えば 50 以下）のような比較的分子量の小さいものをいう。

また、本明細書において「アミノ酸残基」とは、特に言及する場合を除いて、ペプチド鎖の N 末端アミノ酸及び C 末端アミノ酸を包含する用語である。

なお、本明細書中に記載されるアミノ酸配列は、常に左側が N 末端側であり右側が C 末端側である。

【0028】

本明細書において所定のアミノ酸配列に対して「改変アミノ酸配列」とは、当該所定のアミノ酸配列が有する機能（例えば上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドが有するカルレティキュリン発現誘導活性）を損なうことなく、1 個又は数個（例えば 2 個又は 3 個）のアミノ酸残基が置換、欠失及び / 又は付加（挿入）されて形成されたアミノ酸配列をいう。例えば、1 個又は数個（典型的には 2 個又は 3 個）のアミノ酸残基が保守的に置換したいわゆる同類置換（conservative amino acid replacement）によって生じた配列（例えば塩基性アミノ酸残基が別の塩基性アミノ酸残基に置換した配列：例えばリジン残基とアルギニン残基との相互置換）、或いは、所定のアミノ酸配列について 1 個又は数個（典型的には 2 個又は 3 個）のアミノ酸残基が付加（挿入）した若しくは欠失した配列等は、本明細書でいうところの改変アミノ酸配列に包含される典型例である。従って、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドには、各配列番号のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列で構成される合成ペプチドに加え、各配列番号のアミノ酸配列において 1 個又は数個（典型的には 2 個又は 3 個）のアミノ酸残基が置換（例えば上記同類置換）、欠失及び / 又は付加したアミノ酸配列であって、同様にカルレティキュリン発現誘導活性を示すアミノ酸配列からなる合成ペプチドを包含する。

【0029】

本明細書において「多能性幹細胞（pluripotent stem cell）」とは、胎盤などの胚体外組織を除いた一つの生物体を形成する種々の細胞種へ分化可能な能力（多分化能、多能性）を有し、さらに、未分化状態で自己複製能を有する幹細胞をいう。例えば、ES 細胞、iPS 細胞、EG 細胞（胚性生殖細胞；embryonic germ cell）が挙げられる。特に「誘導多能性幹細胞（iPS 細胞）」とは、分化した細胞（典型的には体細胞、例えば皮膚の線維芽細胞等）を人為的に初期化（リプログラミング）することで多分化能と自己複製能を獲得させた細胞をいう。分化細胞を初期化する方法としては、例えば数種の初期化因子（例えば Oct3/4、Klf4、c-Myc 及び Sox2 の 4 種の遺伝子又は Oct3/4、Sox2、Nanog 及び Lin28 の 4 種の遺伝子等）を当該細胞内に導入する方法が挙げられる。なお、上記 iPS 細胞は、上記多能性幹細胞の性質を維持する限り分子生物学的操作（例えば、カルレティキュリン発現を標識するためのマーカー遺伝子の導入、レポーター遺伝子の導入、蛍光タンパク質融合タンパク質発現ベクターの導入等）をされてもよい。

なお、本明細書において iPS 細胞の由来は特に限定されないが、特にヒト由来の iPS 細胞は医療産業上の利用価値が高いため本発明の実施対象として特に好ましい。

【0030】

本明細書において「ゲノム安定性」、「ゲノム不安定性」とは、広義に解釈される用語であり、典型的には以下に挙げるゲノムの構造的な及び / 又は機能的な異常の有無又はその程度を指標として安定か不安定かで区分するために用られ得る用語である。例えば、DNA 塩基配列の局所的な異常（例えば、塩基置換、点変異、遺伝子重複、遺伝子間の DNA 領域の混ぜ合わせ、又は遺伝子の水平伝播等）、染色体の異常（例えば、部分的な重複、逆位、欠失、転座、切断といった染色体の部分的異常、異数体といった染色体の数的異常、又は多核化等）、或いはエピジェネティックな異常（DNA メチル化の変化、ヒストン修飾の変化、クロマチン構造の変化、又は非翻訳 RNA の変化等）の有無又はその程度に基づいて、ゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別することが可能であるが、本発明の実施に好適なゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の区分として、染色体異常を指標としてゲノム安定性がゲノム不安定性かを区分することができる。ここで、染色体異常とは、いわゆる「核型異常」を包含してもよい。染色体異常のなかでも特に、異数体、好ま

しくは重複異常、さらに好ましくは12番染色体の重複、の有無又はその程度でゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を区分け(評価)してもよい。

【0031】

ここで開示されるヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞培養物若しくはES細胞培養物)のゲノム安定性を評価する方法は、対象となるiPS細胞等の多能性幹細胞を含む培養物を準備することと、該培養物中の多能性幹細胞(例えば、培養物中に含まれる多能性幹細胞集団の全部若しくは一部、又は、個々の多能性幹細胞)のカルレティキュリンの発現量(典型的には対象の多能性幹細胞の細胞膜上のカルレティキュリン存在量)を調べ、該カルレティキュリンの発現量の程度に基づいて対象の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別することと、を特徴とする評価方法である。ゲノム不安定なiPS細胞等の多能性幹細胞はゲノム安定な多能性幹細胞と比較してカルレティキュリン発現量が顕著に増大しているため、培養物中の多能性幹細胞のカルレティキュリンの発現量を調べることで当該幹細胞のゲノム安定性若しくは不安定性を判別することができる。

10

【0032】

上記多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法は、上記判別において、カルレティキュリンの発現量が所定レベルを上回った多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞若しくはES細胞)をゲノム不安定と判別する。例えば、予めゲノム安定であることが確認されたiPS細胞(例えば、比較対象の基準例として正常な核型を有するiPS細胞として一般に入手可能な201B7クローン株等が挙げられる)におけるカルレティキュリン発現量及び/又は予めゲノム不安定な細胞を含むことが確認されたiPS細胞培養物(例えば、正常な12番染色体が3倍体であるiPS細胞として一般に入手可能な201B2クローン株等)におけるカルレティキュリン発現量を比較することで、評価対象のiPS細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別し得るカルレティキュリン発現量のレベルを設定することができる。多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別し得るカルレティキュリン発現量のレベルは、カルレティキュリン発現量の測定方法の感度や精度等によって異なるため、採用する測定方法に応じて設定することができる。例えば、予めゲノム安定であることが確認された比較対象である多能性幹細胞(例えばiPS細胞)におけるカルレティキュリン発現量に比べて好ましくは1.2倍以上(例えば1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは5倍以上、例えば10倍以上)のカルレティキュリンを発現する多能性幹細胞をゲノム不安定と判別することができる。なお、上記評価対象の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別し得るカルレティキュリン発現量のレベルは、由来が同じ多能性幹細胞を用いて設定することが好ましい。

20

30

【0033】

ここで開示されるiPS細胞等の多能性幹細胞におけるカルレティキュリン発現量を調べる方法(測定方法)は、カルレティキュリン発現量の程度が定性的もしくは定量的に把握可能な方法であれば特に限定されない。例えば、カルレティキュリン発現量の程度を直接把握し得る方法として、ウエスタンブロッティング、免疫抗体法(典型的には免疫組織化学法、Immunohistochemistry、IHC、なお「免疫染色法」ともいう)、又はそれらを応用した方法等が挙げられる。また、カルレティキュリン遺伝子の発現状態からカルレティキュリンの発現程度を間接的に把握し得る方法としては、例えば、ノーザンブロッティング、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、in situハイブリダイゼーション、又はそれらを応用した方法等が挙げられる。或いは、対象のiPS細胞等の多能性幹細胞に分子生物学的手法を用いて予め導入しておいた標識(典型的には導入遺伝子の転写産物或いは翻訳産物等)をマーカー(目印)にカルレティキュリン発現量の程度を把握し得る方法として、例えば、レポーターアッセイ法、蛍光タンパク質融合カルレティキュリンの測定等が挙げられる。なお、上記カルレティキュリン発現量の測定方法はあくまでも例示であり、これに限定されない。上記カルレティキュリン発現量の測定方法は、1つの方法を単独で用いてもよいし、2つ以上の方法を組み合わせて使用してもよい。

40

【0034】

50

上記多能性幹細胞（例えばiPS細胞）のゲノム安定性若しくは不安定性の判別は、カルレティキュリン又はその断片と特異的に反応する抗体（即ち抗カルレティキュリン抗体）を用いた免疫学的手法（例えば、ウエスタンブロッティングや免疫抗体法等）によって好適に実施することができる。抗カルレティキュリン抗体を用いた免疫学的手法は、カルレティキュリン発現量の程度を高特異的且つ高感度に直接的な把握が可能のため好ましい。特に、免疫抗体法（典型的には免疫染色法）は、iPS細胞等の多能性幹細胞の形態を保ったまま（即ち、細胞破碎、細胞溶解をすることなく）当該幹細胞におけるカルレティキュリン発現量の程度を調べ得るため、個々の多能性幹細胞におけるカルレティキュリン発現量の程度を把握したい場合に特に好適な測定方法である。また、免疫抗体法（典型的には免疫染色法）によると、iPS細胞等の多能性幹細胞の細胞表面（典型的には細胞膜の表面）に存在するカルレティキュリンのみ（即ち、細胞内に恒常的に発現するカルレティキュリンの発現量の影響を受けることなく）を特異的に識別することができるため、上記多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の判別を高精度に実現することができる。

10

20

30

40

50

【0035】

なお、免疫学的手法とは、典型的には、抗原（又はその断片）と特異的に反応する抗体とを抗原抗体反応させて免疫複合体を形成し、該抗体を検出（可視化）することで抗原量を把握する方法である。本発明においては、予め何らかの標識をした抗カルレティキュリン抗体を用いる方法（直接法）、又は、抗カルレティキュリン抗体を特異的に認識する標識二次抗体を用いる方法（間接法）のどちらの方法も好適に使用できる。間接法は直接法に比べて高感度にカルレティキュリン発現量の程度を把握し得るため特に好ましい。抗カルレティキュリン抗体を検出（可視化）する方法としては、例えば、免疫蛍光抗体法、酵素抗体法、オートラジオグラフィー、金コロイド法等が挙げられる。例えば、免疫蛍光抗体法は、抗カルレティキュリン抗体若しくは二次抗体を予め蛍光色素で標識しておき、抗原抗体反応の後に当該蛍光色素の励起光を当てることで蛍光色素を蛍光発色させ、蛍光顕微鏡等を用いて当該蛍光発色を検出する方法である。免疫蛍光抗体法は、高精度にカルレティキュリン発現量の程度を把握し得るため特に好ましい方法である。なお、本明細書において「抗体」とは、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のどちらも包含し、免疫動物（抗体産生動物、Host、Source）や免疫グロブリンの定常領域の違い（アイソタイプ、クラスともいう）に限定されない。

【0036】

典型的には、iPS細胞培養物中のiPS細胞に対して抗カルレティキュリン抗体を抗原抗体反応させ、次いで該抗カルレティキュリン抗体に対する蛍光標識二次抗体を反応させる。その後、該蛍光標識の蛍光発光を蛍光顕微鏡等で検出することにより、iPS細胞におけるカルレティキュリン発現量（典型的にはiPS細胞の細胞表面に存在するカルレティキュリン発現量）を把握することができる。

【0037】

或いはまた、対象の多能性幹細胞（例えばiPS細胞）が生きたままの状態（即ち、細胞固定の操作をすることなく）該幹細胞におけるカルレティキュリン発現量の程度を調べ得る方法は、後述の多能性幹細胞を含む培養物の製造方法の実施に好適である。例えば、免疫抗体法や蛍光タンパク質融合カルレティキュリンの測定を応用することで、生きたままの多能性幹細胞（例えばiPS細胞若しくはES細胞）におけるカルレティキュリン発現量を調べ得る。

【0038】

ここで開示されるヒト又は他の哺乳動物由来の多能性幹細胞（典型的にはiPS細胞若しくはES細胞）の培養物を準備する方法は特に限定されず、従来公知の方法を採用することができる。例えば、ES細胞の培養条件と同様の条件を好適に採用し得る。フィーダー細胞（例えば、SNL76/7細胞、STO細胞、MEF細胞等）の有無についても特に限定されないが、多能性幹細胞培養物中（例えばiPS細胞培養物中）の多能性幹細胞におけるカルレティキュリンの発現量を調べる観点からは、フィーダー細胞を必要としな

い培養物を準備することが好ましい。なお、i P S 細胞等の多能性幹細胞の接着性向上の観点から、多能性幹細胞を培養する培養容器の底面（典型的には多能性幹細胞の接着面）は接着基質（例えば、マトリゲル、脱落膜由来細胞の細胞外マトリクス、ゼラチン、細胞接着タンパク質等）で処理（コート）しておくことが好ましい。例えば、底面をマトリゲルコートした培養皿中に一般的に市販されている i P S 細胞用培地を注入し、当該培養皿中に対象の i P S 細胞を播種した後、所定時間培養することで該 i P S 細胞培養物を準備することができる。

【 0 0 3 9 】

或いはまた、ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法は、対象の多能性幹細胞（典型的には i P S 細胞若しくは E S 細胞）のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別するより前に、当該幹細胞（典型的には当該幹細胞培養物の培地中）に上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドを少なくとも一回供給し、該合成ペプチドを少なくとも一回供給した該幹細胞培養物を所定時間培養した後上記判別を行うことでより好適に実施できる。

上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドを対象の多能性幹細胞（例えば i P S 細胞）に供給し、所定時間培養することで、ゲノム不安定な多能性幹細胞におけるカルレティキュリンの発現量を特に増大させることができる。これにより、ゲノム不安定な多能性幹細胞とゲノム安定な多能性幹細胞とのカルレティキュリン発現量の差を、カルレティキュリン発現誘導ペプチドを添加しない場合と比較してより明確にすることができる。そのため、該カルレティキュリンの発現量の程度に基づいた多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の判別を高精度且つ高い信頼性で実現可能となる。

なお、上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドは、ゲノム不安定なヒト由来の i P S 細胞のカルレティキュリン発現量を顕著に増大し得る。そのため、ここで開示される i P S 細胞のゲノム安定性評価方法は、特にヒト由来の i P S 細胞について好適に実施することができる。

【 0 0 4 0 】

上記カルレティキュリン発現誘導ペプチドを対象の多能性幹細胞（例えば i P S 細胞）の培養物中に添加した後当該培養物を培養する時間は、ゲノム不安定な多能性幹細胞においてカルレティキュリンの発現を誘導可能或いはカルレティキュリンの発現量を増大可能な時間であれば、特に限定されない。典型的には数時間から数日間の培養を行う。例えば、2 時間以上、好ましくは 2 4 時間以上、より好ましくは 4 8 時間以上の培養がよく、例えば培養開始から 3 日～5 日間、あるいは 6 日～7 日間、あるいは 1 0 日間程度の培養を行うとよい。

【 0 0 4 1 】

上述のとおり、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、以下のアミノ酸配列：

C R A K A G D P C（配列番号 1）；および

C E Q K Q E I R C（配列番号 2）；

のうちのいずれか若しくは該アミノ酸配列において 1 個、又は 2 個、又は 3 個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変アミノ酸配列のいずれかからなるカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列を含む合成ペプチドである。配列番号 1 又は配列番号 2 に示される具体的なアミノ酸配列は、ヒト由来のセントリン 2 の s i R N A を構成する R N A 配列を翻訳して得られるアミノ酸配列（以下「セントリン 2 s i R N A 関連配列」ともいう）であることに加え、ゲノム不安定な i P S 細胞等の多能性幹細胞におけるカルレティキュリンの発現を誘導する或いはカルレティキュリンの発現量を増大させることが本発明者によって新たに見出された配列である。

ここで、セントリンとは、真核生物の中心体に存在し、中心子の構成タンパク質の一つとして中心子の複製や微小管の切断に関与する中心体関連タンパク質であり、セントリン 2 とは、セントリンファミリー（典型的には、セントリン 1、セントリン 2、セントリン 3 等）に属するタンパク質のうちの一つである（非特許文献 3 参照）。

【0042】

また、ヒト由来のセントリン2 s i R N A 関連配列の典型的な改変アミノ酸配列として、以下のアミノ酸配列：

R A K A G D P (配列番号3)；および

E Q K Q E I R (配列番号4)；

が挙げられる。配列番号3又は配列番号4に示すアミノ酸配列は、配列番号1又は配列番号2に示すアミノ酸配列のN末端及びC末端のシステイン残基(C)を欠失した配列である。ここに挙げるセントリン2 s i R N A 関連配列の改変アミノ酸配列もまた、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列として好適に機能する。なお、配列番号3および配列番号4に示した上述の改変アミノ酸配列はあくまでも例示であり、使用可能なセントリン2 s i R N A 関連配列の改変アミノ酸配列をかかると限定することを意図するものではない。

10

【0043】

或いはまた、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、配列番号1又は配列番号2に示すカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列又はその改変アミノ酸配列のみから成る合成ペプチドであってもよいが、カルレティキュリン発現誘導活性を向上する観点からは、当該カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列のN末端側もしくはC末端側に膜透過性ペプチド配列を有する合成ペプチドが好ましい。膜透過性ペプチド配列を有する合成ペプチドであれば、目的の多能性幹細胞(例えばi P S細胞)に供給した際、細胞内に速やかに導入され得ることによりカルレティキュリン発現誘導活性を向上させることができる。

20

上記膜透過性ペプチド配列は、細胞膜及び/又は核膜を通過し得る膜透過性ペプチドを構成するアミノ酸配列であれば特に限定なく使用することができる。多くの好適な膜透過性ペプチド配列が知られているが、例えばN o L S (核小体局在シグナル、Nucleolar localization signal)に関連するアミノ酸配列(改変アミノ酸配列を含む)がカルレティキュリン発現誘導ペプチドの膜透過性ペプチド配列のアミノ酸配列として好ましい。例えば、配列番号5に示すL I M キナーゼ2 (LIM Kinase 2)に含まれるN o L S並びに配列番号6に示すI B V (トリ伝染性気管支炎ウイルス：avian infectious bronchitis virus)のNタンパク質(nucleocapsid protein)に含まれるN o L Sのアミノ酸配列が挙げられる。また、他の膜透過性ペプチド配列の例として、配列番号7～9に示すアミノ酸配列およびそれらの改変アミノ酸配列(膜透過性を保持しているものに限られる)が挙げられる。配列番号7は、H I V (ヒト免疫不全ウイルス：Human Immunodeficiency Virus)のT A Tに含まれる膜透過性ペプチド配列のアミノ酸配列を示している。配列番号8は、上記T A Tを改変した膜透過性ペプチド配列(P T D 4)のアミノ酸配列を示している。配列番号9は、ショウジョウバエ(Drosophila)の変異体であるAntennapediaのA N T 関連アミノ酸配列を示している。

30

なお、配列表に示した上述の膜透過性ペプチド配列はあくまでも例示であり、使用可能なペプチド配列はこれに限定されない。本発明の実施に使用可能な様々な膜透過性ペプチド配列が本願出願当時出版されている数々の文献に記載されている。それら膜透過性ペプチド配列のアミノ酸配列は一般的な検索手段によって容易に知ることができる。

40

【0044】

特に、特許文献1にも記載されている配列番号5に示すアミノ酸配列(改変アミノ酸配列を含む)が膜透過性ペプチド配列として好ましい。かかる配列番号5に示す膜透過性ペプチド配列と上記カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列(配列番号1若しくは2)又はその改変アミノ酸配列とを組み合わせることにより、高いカルレティキュリン発現誘導活性を示す合成ペプチドを得ることができる。

【0045】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、以下のアミノ酸配列：

K K R T L R K N D R K K R G G C R A K A G D P C (配列番号10)；

K K R T L R K N D R K K R G G C E Q K Q E I R C (配列番号11)；

50

K K R T L R K N D R K K R G G R A K A G D P (配列番号 12) ; および
K K R T L R K N D R K K R G G E Q K Q E I R (配列番号 13) ;

のうちから選択されるいずれかのアミノ酸配列または該選択されたアミノ酸配列の改変アミノ酸配列を特に好ましく含有する。配列番号 10 又は配列番号 11 に示すアミノ酸配列は、上記配列番号 1 又は配列番号 2 に示すヒト由来のセントリン 2 s i R N A 関連配列と、上記配列番号 5 に示す L I M キナーゼ 2 の N o L S 由来のアミノ酸配列とを、2 個のグリシン (G) 残基から成るリンカーを介して組み合わせることにより構築された合計 24 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である。また、配列番号 12 又は配列番号 13 に示すアミノ酸配列は、上記配列番号 3 又は配列番号 4 に示すヒト由来のセントリン 2 s i R N A 関連配列の典型的な改変アミノ酸配列と、上記配列番号 5 に示す L I M キナーゼ 2 の N o L S 由来のアミノ酸配列とを、2 個のグリシン (G) 残基から成るリンカーを介して組み合わせることにより構築された合計 22 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【0046】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドのペプチド鎖 (アミノ酸配列) のうちの幾つかは、上述したようなカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と、膜透過性ペプチド配列とを適宜組み合わせることにより構築することができる。カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列の何れが相対的に C 末端側 (N 末端側) に配置されてもよい。また、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列とは隣接して配置されるのが好ましい。即ち、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列との間には、両配列部分に包含されないアミノ酸残基が存在しないか或いは存在していても該残基数が 1 ~ 3 個程度が好ましい。例えば、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列との間にリンカーとして機能する 1 個又は数個 (典型的には 2 個又は 3 個) のアミノ酸残基 (例えば 1 個又は数個のグリシン (G) 残基) を含むものであり得る。

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、少なくとも一つのアミノ酸残基がアミド化されているものが好ましい。アミノ酸残基 (典型的にはペプチド鎖の C 末端アミノ酸残基) のカルボキシル基のアミド化により、合成ペプチドの構造安定性 (例えばプロテアーゼ耐性) を向上させることができる。

【0047】

カルレティキュリン発現誘導ペプチドは、上記カルレティキュリン発現誘導活性を失わない限りにおいて、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列を構成するアミノ酸配列以外の配列 (アミノ酸残基) 部分を含み得る。特に限定するものではないが、かかる部分配列としてはカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列部分の 3 次元形状 (典型的には直鎖形状) を維持し得る配列が好ましい。該カルレティキュリン発現誘導ペプチドは、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が 100 以下が適当であり、60 以下が望ましく、50 以下が好ましい。例えば 30 以下の合成ペプチドが特に好ましい。

このような鎖長の短いペプチドは、化学合成が容易であり、容易にカルレティキュリン発現誘導ペプチドを提供することができる。なお、ペプチドのコンホメーション (立体構造) については、使用する環境下 (生体外若しくは生体内) でカルレティキュリン発現誘導活性を発揮する限りにおいて、特に限定されるものではないが、免疫原 (抗原) になり難いという観点から直鎖状又はヘリックス状のものが好ましい。このような形状のペプチドはエピトープを構成し難い。かかる観点から、本発明に適用するカルレティキュリン発現誘導ペプチドとしては、直鎖状であり比較的分子量 (典型的には 60 以下 (特に 30 以下) のアミノ酸残基数) のものが好適である。

【0048】

全体のアミノ酸配列に対するカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列の占める割合 (即ちペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数に占めるカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列を構成するアミノ酸残基数の個数 %) は、カルレティキュリン発現誘導活性を失わない限り特に限定されないが、当該割合

は概ね60%以上が望ましく、80%以上が好ましい。90%以上が特に好ましい。カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列と膜透過性ペプチド配列とから成る（即ち、これらの配列が全アミノ酸配列の100%を占める）ペプチドは好適な一形態である。

なお、本発明のカルレティキュリン発現誘導ペプチドとしては、全てのアミノ酸残基がL型アミノ酸であるものが好ましいが、カルレティキュリン発現誘導活性を失わない限りにおいて、アミノ酸残基の一部又は全部がD型アミノ酸に置換されているものであってもよい。

【0049】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、一般的な化学合成法に準じて容易に製造することができる。例えば、従来公知の固相合成法又は液相合成法のいずれを採用してもよい。アミノ基の保護基としてBoc (t-butyloxycarbonyl) 或いはFmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) を適用した固相合成法が好適である。

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、市販のペプチド合成機（例えば、Intavis AG社、Protein Technologies社等から入手可能である。）を用いた固相合成法により、所望するアミノ酸配列、修飾（C末端アミド化等）部分を有するペプチド鎖を合成することができる。

【0050】

或いは、遺伝子工学的手法に基づいてカルレティキュリン発現誘導ペプチドを生合成してもよい。すなわち、所望するカルレティキュリン発現誘導ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（ATG開始コドンを含む。）のポリヌクレオチド（典型的にはDNA）を合成する。そして、合成したポリヌクレオチド（DNA）と該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント（プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメントを包含する。）とから成る発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを、宿主細胞に応じて構築する。

一般的な技法によって、この組換えベクターを所定の宿主細胞（例えばイースト、昆虫細胞、植物細胞）に導入し、所定の条件で当該宿主細胞又は該細胞を含む組織や個体を培養する。このことにより、目的とするペプチドを細胞内で発現、生産させることができる。そして、宿主細胞（分泌された場合は培地中）からペプチドを単離し、必要に応じてリフォールディング、精製等を行うことによって、目的のカルレティキュリン発現誘導ペプチドを得ることができる。

なお、組換えベクターの構築方法及び構築した組換えベクターの宿主細胞への導入方法等は、当該分野で従来から行われている方法をそのまま採用すればよく、かかる方法自体は特に本発明を特徴づけるものではないため、詳細な説明は省略する。

【0051】

例えば、宿主細胞内で効率よく大量に生産させるために融合タンパク質発現システムを利用することができる。すなわち、目的のカルレティキュリン発現誘導ペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子（DNA）を化学合成し、該合成遺伝子を適当な融合タンパク質発現用ベクター（例えばノバジェン社から提供されているpETシリーズ及びアマシャムバイオサイエンス社から提供されているpGEXシリーズのようなGST (Glutathione S-transferase) 融合タンパク質発現用ベクター）の好適なサイトに導入する。そして該ベクターにより宿主細胞（典型的には大腸菌）を形質転換する。得られた形質転換体を培養して目的の融合タンパク質を調製する。次いで、該タンパク質を抽出し、精製する。次いで、得られた精製融合タンパク質を所定の酵素（プロテアーゼ）で切断し、遊離した目的のペプチド断片（設計したカルレティキュリン発現誘導ペプチド）をアフィニティークロマトグラフィー等の方法によって回収する。また、必要に応じて適当な方法によってリフォールディングする。このような従来公知の融合タンパク質発現システム（例えばアマシャムバイオサイエンス社により提供されるGST/Hisシステムを利用し得る。）を用いることによって、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドを製造することができる。

或いは、無細胞タンパク質合成システム用の鋳型DNA（即ちカルレティキュリン発現誘導ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む合成遺伝子断片）を構築し、ペプチド合成に必要な種々の化合物（ATP、RNAポリメラーゼ、アミノ酸類等）を使用し、いわゆる無細胞タンパク質合成システムを採用して目的のポリペプチドをインビトロ（生体外、in vitro）合成することができる。無細胞タンパク質合成システムについては、例えばShimizuらの論文(Shimizu et al., Nature Biotechnology, 19, 751-755(2001))、Madinらの論文(Madin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(2), 559-564(2000))が参考になる。これら論文に記載された技術に基づいて、本願出願時点において既に多くの企業がポリペプチドの受託生産を行っており、また、無細胞タンパク質合成用キット（例えば、日本の東洋紡績（株）から入手可能なPROTEIOS（商標）Wheat germ cell-free protein synthesis kit）が市販されている。

10

【0052】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドをコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドは、従来公知の方法によって容易に製造（合成）することができる。すなわち、設計したアミノ酸配列を構成する各アミノ酸残基に対応するコドンを選択することによって、カルレティキュリン発現誘導ペプチドのアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列が容易に決定され、提供される。そして、ひとたびヌクレオチド配列が決定されれば、DNA合成機等を利用して、所望するヌクレオチド配列に対応するポリヌクレオチド（一本鎖）を容易に得ることができる。さらに得られた一本鎖DNAを鋳型として用い、種々の酵素的合成手段（典型的にはPCR）を採用して目的の二本鎖DNAを得ることができる。また、ポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもよく、RNA（mRNA等）の形態であってもよい。DNAは、二本鎖又は一本鎖で提供され得る。一本鎖で提供される場合は、コード鎖（センス鎖）であってもよく、それと相補的な配列の非コード鎖（アンチセンス鎖）であってもよい。

20

こうして得られるポリヌクレオチドは、上述のように、種々の宿主細胞中で又は無細胞タンパク質合成システムにて、カルレティキュリン発現誘導ペプチド生産のための組換え遺伝子（発現カセット）を構築するための材料として使用することができる。

【0053】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドは、上記多能性幹細胞（典型的にはiPS細胞若しくはES細胞）におけるカルレティキュリン発現誘導活性を損なわない限りにおいて塩の形態であってもよい。例えば、常法に従って通常使用されている無機酸又は有機酸を付加反応させることにより得られ得る該ペプチドの酸付加塩を使用することができる。或いは、上記多能性幹細胞におけるカルレティキュリン発現誘導活性を有する限り、他の塩（例えば金属塩）であってもよい。従って、本明細書及び特許請求の範囲に記載の「ペプチド」は、かかる塩形態のものを包含する。

30

【0054】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導剤は、有効成分であるカルレティキュリン発現誘導ペプチドのカルレティキュリン発現誘導活性が失われない状態で保持し得る限りにおいて、使用形態に応じて種々の担体を含み得る。希釈剤、賦形剤等としてペプチド医薬において一般的に使用される担体が好ましい。カルレティキュリン発現誘導剤の用途や形態に応じて適宜異なり得るが、典型的には、水、生理学的緩衝液、種々の有機溶媒が挙げられる。適当な濃度のアルコール（エタノール等）水溶液、グリセロール、オリーブ油のような不乾性油であり得る。或いはリポソームであってもよい。また、カルレティキュリン発現誘導剤に含有させ得る副次的成分としては、種々の充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、色素、香料等が挙げられる。

40

カルレティキュリン発現誘導剤の形態に関して特に限定はない。例えば、典型的な形態として、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセル、軟膏、水性ジェル剤等が挙げられる。また、使用直前に生理食塩水又は適当な緩衝液（例えばPBS、即ちリン酸緩衝生理食塩水）等に溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物

50

、造粒物とすることもできる。

なお、カルレティキュリン発現誘導ペプチド（主成分）及び種々の担体（副成分）を材料にして種々の形態の薬剤（組成物）を調製するプロセス自体は従来公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本発明を特徴づけるものでもないため詳細な説明は省略する。処方に関する詳細な情報源として、例えばComprehensive Medicinal Chemistry, Corwin Hansch監修, Pergamon Press刊(1990)が挙げられる。この書籍の全内容は本明細書中に参照として援用されている。

【0055】

ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導剤（即ち、カルレティキュリン発現誘導ペプチド）は、その形態及び目的に応じた方法や用量で 사용할 ことができる。

例えば、インビトロで培養（継代）している多能性幹細胞（典型的にはiPS細胞若しくはES細胞）に対し、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導剤（即ち、カルレティキュリン発現誘導ペプチド）の適量を、培養過程のいずれかの段階（好ましくはゲノム安定性の評価を行うより前の段階）で培地に添加するとよい。添加量及び添加回数は、多能性幹細胞の種類や状態、細胞密度（培養開始時の細胞密度）、継代数、培養条件、培地の種類、等の条件によって異なり得るため特に限定されない。典型的には、培地中のペプチド濃度が概ね0.1 μ M ~ 100 μ Mの範囲内、好ましくは0.5 μ M ~ 20 μ M（例えば1 μ M ~ 10 μ M）の範囲内となるように、1 ~ 複数回添加する（例えば培養開始時並びに細胞の継代時や培地交換時に合わせて追加添加する）ことが好ましい。

また、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導剤（即ち、カルレティキュリン発現誘導ペプチド）は、ゲノム安定性の評価に利用可能な多能性幹細胞の他の特徴（即ち、カルレティキュリン発現量ではない多能性幹細胞の特徴）を増強し得る他の化合物及び/又は該他の特徴を増強する方法と併用することも可能である。

【0056】

ここで開示される多能性幹細胞培養物中（典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES細胞培養物中）からゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法は、上述の多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法によって対象の多能性幹細胞培養物中に含まれるiPS細胞等の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別し、該判別方法によりゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を当該幹細胞培養物中から除去することを特徴とする。

ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中から除去することで、ゲノム安定な多能性幹細胞を主体とする多能性幹細胞培養物（例えばiPS細胞培養物）を製造することができる。例えば、培養物中に含まれる多能性幹細胞の大部分（例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは98%以上）をゲノム安定な多能性幹細胞が占める多能性幹細胞培養物を製造することができる。培養物中に含まれる実質的に全ての多能性幹細胞がゲノム安定な多能性幹細胞からなる（典型的には、ゲノム安定な多能性幹細胞が実質的に100%を占める）多能性幹細胞培養物は、好適な一態様である。特に、ヒト由来のiPS細胞は医療産業上の利用価値が高いため、上記対象の多能性幹細胞の好適例である。

【0057】

また、上記ゲノム不安定な多能性幹細胞の除去方法を実施することで得られるiPS細胞培養物等の多能性幹細胞培養物（即ち、対象の多能性幹細胞培養物中からゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を除去した後の当該幹細胞培養物）において、該培養物中に含まれる実質的に全ての多能性幹細胞が生細胞である（例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上）多能性幹細胞培養物は、産業上の利用価値が高い。特に、上記培養物中に含まれる多能性幹細胞が生細胞である（即ち、生細胞が実質的に100%を占める）多能性幹細胞培養物は特に好適な一態様である。

【0058】

上述の多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法によりゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中（典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES

10

20

30

40

50

細胞中)から除去するために利用可能な多能性幹細胞の特徴(マーカー、標識、目印)としては、例えば、カルレティキュリンの発現状態、カルレティキュリン遺伝子の発現状態、カルレティキュリンの発現と相関性の高いタンパク質若しくはRNAの発現状態、分子生物学的手法により多能性幹細胞に予め導入しておいた導入遺伝子の発現状態、染色体の状態(例えば、染色体異常、多核化等)、ゲノム不安定な細胞において発現量が変化することが知られているタンパク質若しくはRNAの発現状態、又はゲノム不安定な多能性幹細胞特異的な生理的性質(増殖性、接着性、遊走性、細胞分裂の特徴、栄養要求性等)等が挙げられる。なお、上記多能性幹細胞の特徴はあくまでも例示であり、上記評価方法によりゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞(例えばiPS細胞)を対象の多能性幹細胞培養物中から除去するために利用可能な多能性幹細胞の特徴であれば、特にこれに限定されない。また、上記多能性幹細胞の特徴は、1つの特徴を単独で利用することもできるし、2つ以上の特徴を組み合わせることもできる。

10

20

30

40

50

【0059】

対象の多能性幹細胞培養物中の多能性幹細胞(例えばiPS細胞)におけるカルレティキュリンの発現状態は、上記多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法における多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の判別基準として用いた多能性幹細胞の特徴と同じ特徴であるため、上記評価方法によってゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中(例えばiPS細胞培養物中)から正確に除去する観点で好適に利用することができる。特に、多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞)の細胞表面に存在するカルレティキュリンの存在状態は、ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を精度よく除去できるため、好ましい。

また、上記多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法で多能性幹細胞(典型的にはiPS細胞若しくはES細胞)のカルレティキュリン発現量を把握するために用いた目印(マーカー、標識、特徴)、例えばカルレティキュリン発現量を測定するために用いた抗体の標識等、を当該除去方法においてもそのまま利用することができる。ゲノム安定性評価方法で用いた目印をそのまま利用すれば、ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞の除去に必要な操作を簡便化することができるため好ましい。

【0060】

或いはまた、カルレティキュリンの発現状態は、抗カルレティキュリン抗体を用いた免疫学的手法(抗原抗体反応)による特異性の高い識別が可能であるため、ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を高精度かつ高信頼性に除去する観点で特に好適に利用することができる。典型的には、抗カルレティキュリン抗体若しくは抗カルレティキュリン抗体を特異的に認識する二次抗体に予め何らかの標識をしておき、該標識を目印として、対象の多能性幹細胞培養物中(例えばiPS細胞培養物中)からゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を除去することができる。

上記抗体の標識としては、例えば、蛍光色素、マグネティックビーズ、GSTタグやHisタグといった各種のアフィニティタグ等を利用することができる。典型的には、蛍光標識した抗カルレティキュリン抗体若しくは蛍光標識した二次抗体を用いた免疫蛍光抗体法によりカルレティキュリンを蛍光標識し、該蛍光標識を目印とすることで、ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中から高精度かつ高効率に除去することができる。

【0061】

或いはまた、予め分子生物学的手法により導入しておいた導入遺伝子の転写産物或いは翻訳産物を目印としても、ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中から効率よく除去することができる。例えば、蛍光タンパク質融合カルレティキュリンベクターを対象のiPS細胞に導入しておき、ゲノム不安定なiPS細胞において発現量が増加した蛍光タンパク質融合カルレティキュリンの蛍光発色を目印とすることで、対象のiPS細胞培養物中からゲノム不安定であると判別されたiPS細胞を除去することができる。

【0062】

上記ゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養液から除去する方法は、上記除去に用いる多能性幹細胞の特徴（マーカー、標識、目印）が所定レベルを上回った多能性幹細胞（例えばiPS細胞）を除去することで実現することができる。例えば、上記多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法でゲノム安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞における上記特徴のレベルと、ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞における上記特徴のレベルとを比較することで、上記除去に利用可能な多能性幹細胞の特徴の所定レベルを設定することができる。なお、当該所定レベルは、採用する多能性幹細胞の特徴、該特徴を調べる（測定する）方法、該測定方法の感度や精度によって異なるため、適宜設定する必要がある。

例えば、カルレティキュリン発現量が所定レベルを上回った多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中（典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES細胞培養物中）から除去することで、ゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を除去することができる。ゲノム不安定な多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中から除去する際に利用可能なカルレティキュリンの発現レベルは、ゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞の除去が可能であれば特に限定されない。典型的には、ゲノム安定性評価方法におけるカルレティキュリンの発現レベルと同程度の発現レベルを利用することができる。例えば、ゲノム安定なiPS細胞等の多能性幹細胞（比較対象）におけるカルレティキュリン発現量に比べて好ましくは1.2倍以上（例えば1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは5倍以上、例えば10倍以上）のカルレティキュリン発現量をゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する基準とすることができる。なお、ゲノム不安定な多能性幹細胞を評価対象の多能性幹細胞培養物中から除去する際に利用可能なカルレティキュリンの発現レベルは、由来が同じ多能性幹細胞を用いて設定することが好ましい。

【0063】

ここで開示されるゲノム不安定性であると判別された多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中（典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES細胞培養物中）から除去する方法は、特に限定されず、種々の細胞選別方法を利用することができる。例えば、蛍光標識式細胞分取器（FACS、fluorescence-activated cell sorter）を用いた細胞選別、磁気細胞分離装置（MACS（登録商標））を用いた細胞分別、顕微鏡下での細胞選別、光ピンセットを利用した細胞選別、各種カラムを用いた細胞選別、免疫的手法（抗原抗体反応）を利用した細胞選別、細胞染色を応用した細胞選別、特定導入遺伝子による標識を利用した細胞選別、細胞の生理的性質（増殖性、接着性、遊走性、細胞分裂の特徴、栄養要求性等）を利用した細胞選別などが挙げられる。特に、抗カルレティキュリン抗体を用いた免疫学的手法を利用した細胞選別方法は、高特異的かつ高い信頼性をもって細胞選別を行い得るため、特に好ましい。また、FACS、MACSおよび各種カラムを用いた細胞分別方法は、高効率に細胞を選別可能であるため好ましい。

なお、上記ゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞の除去は、上記対象の多能性幹細胞培養物中の多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の判別と同時に進めてもよい。上記判別と上記除去を同時に行うと、ゲノム不安定な多能性幹細胞の除去に必要な操作を簡便化することができるため好ましい。

【0064】

また、ここで開示されるゲノム不安定であると判別された多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中（典型的にはiPS細胞培養物中若しくはES細胞培養物中）から除去するために用いられる細胞選別機は、特に限定されず、種々の細胞選別機を利用することができる。例えば、FACS、MACS（登録商標）、光ピンセットを応用した細胞選別装置、各種カラムを応用した細胞選別装置が挙げられる。FACS、MACS並びに光ピンセットを応用した細胞選別装置は、自動化により高効率にゲノム不安定であると判別されたiPS細胞等の多能性幹細胞を対象の多能性幹細胞培養物中から除去することができるため、本発明の実施に好適に用いることができる。特にFACSおよびMACSは、上記カルレティキュリン発現量に基づいた多能性幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性の判別とゲノム不安定な多能性幹細胞の除去とを同時に行い得るため、好ましい。

【 0 0 6 5 】

例えば、FACSを使用したゲノム不安定なiPS細胞の除去方法としては、以下の方法が挙げられる。対象のiPS細胞培養物中のiPS細胞に対して抗カルレティキュリン抗体を抗原抗体反応させ、次いで該抗カルレティキュリン抗体に対する蛍光標識二次抗体を反応させる。その後、該蛍光標識の蛍光発光をFACSを用いて分析し、蛍光発光の強度が所定レベルを上回ったiPS細胞を対象のiPS細胞培養物中から除去することで、ゲノム不安定なiPS細胞を除去することができる。上記蛍光発光の強度が所定レベルを上回ったiPS細胞とは、典型的には、予めゲノム安定であることが確認されたiPS細胞（例えば上記201B7株）よりも蛍光強度が強い細胞、若しくは、予めゲノム不安定な細胞を含むことが確認されたiPS細胞（例えば上記201B2株）培養物中のゲノム不安定な細胞の蛍光強度と同程度もしくはそれ以上の蛍光強度の細胞である。

10

【 0 0 6 6 】

なお、上記ゲノム不安定な多能性幹細胞（例えば、iPS細胞若しくはES細胞）の除去方法で除去される多能性幹細胞の典型例としては、染色体異常及び/又は多核化を有する多能性幹細胞が挙げられる。上記多能性幹細胞（該多能性幹細胞を分化誘導して得られる細胞、細胞塊、組織等を含む）は、生体内に移植された後で腫瘍の原因となる虞があるため、再生医療目的の多能性幹細胞培養物中からの除去が特に望まれるゲノム不安定なiPS細胞である。特に染色体異常及び/又は多核化を有するヒト由来のiPS細胞の除去は、本発明の好適な一実施形態である。

20

【 0 0 6 7 】

以下、本発明に関するいくつかの実施例を説明するが、本発明をかかるとは限定することを意図したものではない。

【 0 0 6 8 】

以下の実施例においては、多能性幹細胞の例としてiPS細胞を用いた。具体的な供試細胞としては、ゲノム安定な（具体的には染色体異常のない）ヒト由来のiPS細胞株（クローン名：201B7、以下単に201B7ともいう）と、ゲノム不安定な（具体的には、12番染色体が3倍体（トリソミー）である）細胞を含むヒト由来のiPS細胞株（クローン名：201B2、以下単に201B2ともいう）とを用いた。201B7と201B2はどちらも同じヒト線維芽細胞から樹立されたiPS細胞のクローンである（出典：Takahashi K et al., Cell, 131, 861-872(2007)）。なお、上記iPS細胞は、京都大学iPS細胞研究所から供与されたものを使用した。また、上記iPS細胞の継代培養を行う際、フィーダー細胞としてBaylor College of Medicineよりライセンス供与されたマウス胎児線維芽細胞（細胞株：SNL76/7）を使用した。

30

【 0 0 6 9 】

< 実施例1：iPS細胞培養物の準備（iPS細胞の継代維持）>

以下の方法で上記iPS細胞（201B7及び201B2）を継代維持することで、iPS細胞の培養物を準備した。詳細は以下のとおりである。

【 0 0 7 0 】

まず、各iPS細胞（201B7及び201B2）を播種するより1～4日前に、マイトマイシンC処理して不活化したSNL76/7細胞をゼラチンコートした培養容器（直径10cmの培養ディッシュ）に播種した。当該SNL76/7細胞は、5%CO₂、37℃条件下でiPS細胞を播種する直前まで培養した。そして、iPS細胞をフィーダー細胞上に播種する直前に該フィーダー細胞をPBS（-）（リン酸緩衝生理食塩水）で洗浄し、4ng/mLの組み換えbFGF（Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor：和光純薬社製）を含む霊長類ES/iPS細胞培地（Primate ES Cell Medium：ReproCELL社製、以下ES培地とも呼ぶ）に交換することによって、フィーダー細胞を作製した。

40

次に、各iPS細胞をそれぞれCTK溶液（0.1mg/mLのコラゲナーゼIV（Life Technologies社製品）、1mMの塩化カルシウム、20%のKSR（knockout serum replacement）を含む0.25%トリプシン溶液）を用いて、iPS細胞のコロニー辺縁部

50

が剥離する程度に剥離処理した。CTK溶液をPBS(-)で洗浄除去し、ES培地を添加した後、セルスクレーパーを用いてiPS細胞コロニーを完全に剥離した。15 mL容チューブ中にiPS細胞コロニーが懸濁した培養容器中のESC培地を移し、さらに、培養容器に残ったiPS細胞コロニーをESC培地で洗い込んで該15 mL容チューブに回収した。上記15 mL容チューブを5分間静置してiPS細胞コロニーを沈殿させ、上澄みを取り除いた後、新鮮なES培地中にピペッティングにてiPS細胞コロニーを分散懸濁し、iPS細胞懸濁液を用意した。

このようにして得られたiPS細胞の懸濁物の適量(例えば、同容量の培養容器を用いて継代培養する場合は細胞懸濁液の全量の1/3~1/8量程度)を上記のとおり作製しておいた培養容器中のフィーダー細胞上に播種した。そして培養容器をインキュベータに入れ、5%CO₂、37℃の条件下で培養した。1~2日毎に培地交換を行い、iPS細胞が培養容器底面の80~90%を占める状態(即ち、80~90%コンフルエント)になるまで培養を継続した。上記80~90%コンフルエントになったiPS細胞を上記の方法で継代培養することを繰り返した。このようにして、iPS細胞の培養物を準備した。

【0071】

<実施例2:iPS細胞におけるカルレティキュリン発現量の評価試験>

ゲノム安定なiPS細胞とゲノム不安定なiPS細胞について、カルレティキュリンの発現を調べた。供試細胞として、上記2種のiPS細胞(201B7及び201B2)を用いた。評価試験の詳細は以下のとおりである。

【0072】

実施例1に記載の方法で準備した各iPS細胞(201B7及び201B2)を、それぞれ上記継代培養と同様の方法で15 mL容チューブに回収し、5分間静置した。その後、上澄み液を除去し、新鮮なmTESR(登録商標)1培地(STEMCELL Technologies社製)中にピペッティングにてiPS細胞コロニーを分散懸濁させた。そして、該iPS細胞懸濁液を、マトリゲルコートした8穴(ウェル)スライド中に、1ウェルあたり凡そ1×10⁴個の細胞密度となるように播種した。そして培養容器をインキュベータに入れ、5%CO₂、37℃の条件下で一晩培養を行った。その一晩培養後、培地を新鮮なmTESR(登録商標)1培地に交換し、同条件でさらに5日間培養した。上記5日間の培養期間中は毎日培地交換を行った。

【0073】

上記培養終了後、以下の免疫蛍光抗体法(蛍光免疫染色ともいう)により、各iPS細胞(201B2及び201B7)におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた。

具体的には、まず、各iPS細胞の培養容器中の培地を除去し、PBS(-)で洗浄した。次いで、メタノール1容量とアセトン1容量とを混和した溶液(メタノール/アセトン=1:1溶液)を添加し、氷上に15分静置してiPS細胞を固定した。その後、メタノール/アセトン=1:1溶液を除去し、3%のBSA含有PBS(-)(3%のBSAを含むPBS(-))を添加して室温で1時間のブロッキングを行った。所定時間経過後、3%のBSA含有PBS(-)を除去し、PBS(-)にて洗浄した。

そして、一次抗体として抗カルレティキュリンモノクローナル[FM C75]抗体(マウス由来、Abcam社製、Cat No. ab22683、Lot No. GR56669-4)を1%BSA/PBS(-)(1%のBSAを含むPBS(-))で最終濃度:4×10⁻³ mg/mLに調製した一次抗体希釈液を上記iPS細胞の培養容器中に添加し、4℃で一晩若しくは室温で2時間静置した。かかる抗原抗体反応の所定時間経過後、一次抗体希釈液を除去し、PBS(-)で洗浄した。次いで、二次抗体として蛍光色素(Alexa(登録商標)488)で標識した抗マウスIgG抗体(ヤギ:Life Technologies社製品、A11001)を1%BSA/PBS(-)で最終濃度:10×10⁻³ mg/mLに調製した二次抗体希釈液を添加し、室温で2時間静置した。上記所定時間経過後、二次抗体希釈液を除去し、PBS(-)で洗浄した。その後、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)含有封入液(Life Technologies社製)とカバーガラスを用いて封入を行い、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観

10

20

30

40

50

察を行った。

【 0 0 7 4 】

結果を図 1 又は図 2 に示す。これらの図面は、各 i P S 細胞 (2 0 1 B 7 又は 2 0 1 B 2) におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真であり、上記免疫蛍光抗体法でカルレティキュリンの発現状態を調べた結果を示す蛍光画像と D A P I による核染色画像とを重ねた (マージした) 画像である。図 1 は 2 0 1 B 7 の結果を示し、図 2 には 2 0 1 B 2 の結果を示す。

【 0 0 7 5 】

図 2 に示すように、2 0 1 B 2 の蛍光免疫顕微鏡写真では、図 1 の 2 0 1 B 7 の蛍光顕微鏡写真と比較してカルレティキュリンを検出する蛍光標識の強い発色を確認した。即ち、ゲノム不安定な i P S 細胞 (2 0 1 B 2) は、ゲノム安定な i P S 細胞 (2 0 1 B 7) と比較してカルレティキュリンの発現量が顕著に増大していることが認められた。なお、2 0 1 B 7 において確認されるカルレティキュリンを検出する蛍光標識の弱い発色は、細胞内に恒常的に発現しているカルレティキュリンを検出したものと考察した。また、図 1 中にカルレティキュリンを検出する蛍光標識が強く発色している細胞を幾つか確認した。詳細なデータは示していないが、当該細胞はゲノム不安定な i P S 細胞であったため、継代培養によってゲノムが不安定となった i P S 細胞であると考察した。

このことは、対象の多能性幹細胞の培養物中の多能性幹細胞についてカルレティキュリン発現量を調べ、該カルレティキュリン発現量の程度に基づいて該幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を判別できることを示している。また、上記判別には免疫学的手法が好適に使用できることも示している。

【 0 0 7 6 】

< 実施例 3 : ペプチド合成 >

配列番号 1 0 ~ 1 3 のアミノ酸配列から成る合成ペプチドを後述のペプチド合成機を用いて製造した。なお、以下の説明では、当該合成ペプチドを配列番号の順番に対応してサンプル 1 ~ 4 と呼称する。表 1 には、これら合成ペプチドのアミノ酸配列等の情報を列挙している。

【 0 0 7 7 】

【 表 1 】

表 1

サンプル		
No .	アミノ酸配列	総アミノ酸残基数
1	KKRTLKNDRKRR GG CRAKAGDPC (配列番号 1 0)	2 4
2	KKRTLKNDRKRR GG CEQKQEIRC (配列番号 1 1)	2 4
3	KKRTLKNDRKRR GG RAKAGDP (配列番号 1 2)	2 2
4	KKRTLKNDRKRR GG EQKQEIR (配列番号 1 3)	2 2

【 0 0 7 8 】

表 1 に示すように、サンプル 1 ~ 4 に係るペプチドは、ペプチド鎖の N 末端側に L I M キナーゼ 2 由来のアミノ酸配列 (配列番号 5) を有し、その C 末端側に、2 個のグリシン (G) 残基から成るリンカー領域を介してカルレティキュリン発現誘導ペプチド配列 (配列番号 1 ~ 4) を有している。

サンプル 1 又はサンプル 2 に係るペプチド (配列番号 1 0 又は 1 1) は、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列として配列番号 1 又は 2 に示すセントリン 2 s i R N A 関連

配列をそれぞれ有する合計 24 アミノ酸残基から成るペプチドである。

サンプル 3 又はサンプル 4 に係るペプチド（配列番号 12 又は 13）は、カルレティキュリン発現誘導ペプチド配列として配列番号 3 又は 4 に示すセントリン 2 siRNA 関連配列の典型的な改変配列をそれぞれ有する合計 22 アミノ酸残基から成るペプチドである。

【0079】

なお、上記合成ペプチドは C 末端アミノ酸のカルボキシル基（-COOH）がアミド化（-CONH₂）されている、直鎖状のペプチドである。上記合成ペプチドは市販のペプチド合成機（Intavis AG 社製品）を用いてマニュアルどおりに固相合成法（Fmoc 法）を実施して合成した。なお、ペプチド合成機の使用態様自体は本発明を特徴づけるものではないため、詳細な説明は省略する。

合成したサンプル 1～4 に係るペプチドは、PBS（-）に溶かし、ペプチドストック液を調製した。

【0080】

< 実施例 4：合成ペプチドのカルレティキュリン発現誘導活性評価 >

上記実施例 3 で得られたサンプル 1～4 に係るペプチドについて、カルレティキュリン発現誘導活性を調べた。供試細胞として、上記 iPS 細胞（201B7 及び 201B2）を用いた。評価試験の詳細は以下のとおりである。

【0081】

実施例 2 と同様にして、各 iPS 細胞（201B7 及び 201B2）を、マトリゲルコートした 8 穴（ウェル）スライド中に 1 ウェルあたり凡そ 1×10^4 個となるように播種し、5% CO₂、37℃ の条件下で一晩培養を行った。その一晩培養後、培地をペプチド濃度 10 μM となる量のサンプル 1～4 に係るペプチドを含有する mTESR（登録商標）1 培地に交換し、5 日間培養した。上記 5 日間の培養期間中は、毎日ペプチド濃度 10 μM となる量のサンプル 1～4 に係るペプチドを含有する含有 mTESR（登録商標）1 培地に培地交換をした。なお、比較対象の観点から、コントロール区として各 iPS 細胞についてペプチド無添加区を設けたが、かかるペプチド無添加区の条件は実施例 2 と同じものである。

【0082】

上記培養終了後、実施例 2 と同様にして、各試験区におけるカルレティキュリンの発現を、抗カルレティキュリン抗体を用いた免疫蛍光抗体法により調べた。

【0083】

共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察を行った結果を図 3～図 6 に示す。図 1 又は図 2 と同様に、これらの図面は各試験区におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた蛍光顕微鏡写真であり、上記免疫蛍光抗体法で iPS 細胞におけるカルレティキュリンの発現状態を調べた結果を示す蛍光画像と DAPI による核染色画像とを重ねた（マージした）画像である。図 3 には 201B2 におけるサンプル 1 添加区の結果を示し、図 4 には 201B7 におけるサンプル 1 添加区の結果を示す。また、図 5 及び図 6 は、それぞれ図 2 及び図 1 と同じであり、201B2 及び 201B7 におけるペプチド無添加区の結果である。

【0084】

上記評価試験の結果、サンプル 1 に係る合成ペプチド（カルレティキュリン発現誘導ペプチド）を添加した 201B2（図 3）は、該細胞のペプチド無添加区（図 5）と比較してカルレティキュリンを検出する蛍光標識の強い発色が認められた。即ち、サンプル 1 に係る合成ペプチドは、ゲノム不安定な iPS 細胞においてカルレティキュリンの発現量を顕著に増大させることが認められた。また、ここには図示していないが、サンプル 2～4 に係る合成ペプチドもまた、サンプル 1 と同様に 201B2 におけるカルレティキュリンの発現量を顕著に増大させることが確認された。

一方、201B7 にサンプル 1 に係る合成ペプチドを添加して培養した場合（図 4）は、当該細胞のペプチド無添加区（図 6）と比較してカルレティキュリンを検出する蛍光標

10

20

30

40

50

識の蛍光発色はほとんど増大しないことが確認された。即ち、ペプチド無添加区における 201B7 と 201B2 とのカルレティキュリン発現量を比較するよりも、サンプル 1 添加区における 201B7 と 201B2 とのカルレティキュリン発現量を比較した方が、ゲノム安定性の異なる iPS 細胞間のカルレティキュリン発現量の差を明確に把握することができた。また、ここには図示していないが、サンプル 2 ~ 4 に係る合成ペプチドもまた、サンプル 1 と同様に 201B7 におけるカルレティキュリンの発現量をほとんど増大させず、当該ペプチドを対象の iPS 細胞培養物に添加して所定時間培養することでゲノム安定性の異なる iPS 細胞間のカルレティキュリン発現量の差を明確にし得ることが確認された。

これらのことは、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチド（即ち該ペプチドを有効成分として含むカルレティキュリン発現誘導剤）がゲノム不安定な多能性幹細胞（典型的には iPS 細胞）のカルレティキュリン発現量を顕著に増加させ得るペプチド（組成物）であることを示している。さらに、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチド（即ち該ペプチドを有効成分として含むカルレティキュリン発現誘導剤）を対象の多能性幹細胞（典型的には iPS 細胞）に添加することで、多能性幹細胞のゲノム安定性の違いに起因するカルレティキュリン発現量の違いを増強し、より明確とし得ることも示している。以上より、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチド（即ち該ペプチドを有効成分として含むカルレティキュリン発現誘導剤）を対象の多能性幹細胞（典型的には iPS 細胞）に添加することで、該幹細胞におけるカルレティキュリン発現量の程度に基づいて該幹細胞のゲノム安定性若しくはゲノム不安定性を高感度かつ高精度に判別できることが示された。

【0085】

< 実施例 5 : iPS 細胞培養物中からのゲノム不安定な iPS 細胞の除去試験 >

上記 iPS 細胞（201B7 及び 201B2）を供試細胞として用いて、該 iPS 細胞の培養物中からゲノム不安定な iPS 細胞を除去し得るか試験した。詳細は以下のとおりである。

【0086】

まず、iPS 細胞培養物を以下のとおりに準備した。実施例 1 に記載の方法で準備した各 iPS 細胞（201B7 及び 201B2）を、予め Gel Trex（Life Technologies 社製品）でコートした直径 10 mm の培養皿（10 mm ディッシュ）中に、1 ウェルあたり凡そ 1×10^6 個の細胞密度となるように播種した（即ち、フィーダー細胞フリー）。培地としては、Essential 8（登録商標）培地（Life Technologies 社製品）を使用した。そして培養容器をインキュベータに入れ、5% CO₂、37℃ の条件下で 5 日間培養を行った。上記 5 日間の培養期間中は毎日培地交換を行った。

【0087】

上記培養終了後、各 iPS 細胞に発現するカルレティキュリンを蛍光標識し、該カルレティキュリンを検出する蛍光標識の蛍光発色強度を指標とし、FACS を用いて各 iPS 細胞の培養物中からゲノム不安定な細胞を除去した。具体的な試験方法は、以下のとおりである。

【0088】

まず、上記 5 日間の培養終了後の各 iPS 細胞を ROCK (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase/Rho 結合キナーゼ) 阻害剤で処理した。具体的には、上記 5 日間の培養終了後の各 iPS 細胞の培地中に、ROCK 阻害剤である Y-27632 を培地中の濃度が 10 μ M となるように添加し、その後 5% CO₂、37℃ のインキュベータ内に 1 時間静置した。かかる ROCK 阻害剤存在下での培養（ROCK 阻害剤での処理）が終了した各 iPS 細胞について、培養容器中の培地を除去し、PBS で 1 回洗浄した。

【0089】

次に、上記 ROCK 阻害剤処理をした各 iPS 細胞を所定の試験管にそれぞれ回収した。具体的には、まず、各 iPS 細胞について、0.5 mM の EDTA を含む PBS（-）（以下、「EDTA / PBS（-）」ともいう）を各培養容器内に 3 mL ずつ添加し、5% C

10

20

30

40

50

O₂、37 のインキュベータ内に15分間静置した。次に、培養容器中のEDTA/PBS(-)を除去し、各培養容器内に4mLのPBS(-)を添加し、ピペティングした。かかるピペティングにより、培養容器からiPSを剥離し、上記PBS(-)内にiPS細胞を分散させた。そして、上記iPS細胞が分散した状態のPBS(-)を15mL容チューブに回収し、該15mL容チューブ内にさらに4mLの霊長類ES/iPS細胞培地(Primate ES Cell Medium: ReproCELL社製)を添加した。かかる各iPSを回収した15mL容チューブを120×g(ここで、「×g」は遠心力を示しており、地球の重力加速度に対する相対遠心加速度を意味する。例えば120×gは地球の重力加速度の120倍の相対加速度(遠心力)である。以下同じ。)で5分間の遠心処理を行い、上清(PBS(-)および霊長類ES/iPS細胞培地)を除去し、2%のFBSを含むPBS(以下、該FBS含有PBSを「インキュベーションバッファー」ともよぶ)で1回洗浄(遠心処理条件: 120×g、5分間)した。そして、各iPS細胞を10μMのY-27632を含むインキュベーションバッファー(以下、「Y-27632(10μM)含有インキュベーションバッファー」ともいう)中に分散し、細胞密度が凡そ1×10⁶細胞/100μLの細胞分散液を調整した。そして、かかるiPS細胞分散液のうちの一部を、それぞれ別に準備した1.5mLチューブに分注し、以下の試験に用いた。

10

【0090】

次に、以下の蛍光免疫染色(免疫蛍光抗体法)により、各試験区のiPS細胞の細胞表面に存在するカルレティキュリンを蛍光標識した。

抗カルレティキュリン抗体として、Phycoerythrin(以下、かかる蛍光色素を「PE」ともいう)で標識した抗体(即ち、蛍光PE標識抗体)である、抗カルレティキュリンモノクローナル[FM C 7 5]-Phycoerythrin抗体(マウス由来、Abcam社製、Cat No. ab83220、Lot No. GR177933-2)を用いた。また、上記抗カルレティキュリンモノクローナル[FM C 7 5]-Phycoerythrin抗体のアイソタイプコントロールとして、蛍光PE標識抗体である、Mouse IgG1(PE)-Isotype control(マウス由来、Abcam社製、Cat No. ab81200、Lot No. GR183088-1)を用いた。かかる抗カルレティキュリン抗体(或いは上記アイソタイプコントロール)をY-27632(10μM)含有インキュベーションバッファーで最終濃度: 10μg/mLに調製した抗体希釈液を各試験管に添加し、4 の暗所に1.5時間静置した。かかる所定時間の抗原抗体反応を行った後、130×gで5分間の遠心処理を行い、抗体希釈液を除去し、各iPS細胞を1mLのインキュベーションバッファーで2回洗浄(遠心処理条件: 130×g、5分間)した。次いで、各iPS細胞を300μLのOn-Chip Sample Buffer(オンチップバイオテクノロジー社製)で1回洗浄(遠心処理条件: 260×g、5分間)した。そして、各iPS細胞を、On-Chip Sample Buffer中に分散し、細胞密度が少なくとも5×10⁵細胞/100μL以上の細胞分散液を調整した。

20

30

上述のとおり、上記の蛍光免疫染色では、細胞の固定および透過処理を行わなかった。即ち、抗カルレティキュリン抗体によって、細胞表面のカルレティキュリンを特異的に蛍光免疫染色した。

【0091】

次に、上記蛍光免疫染色を行った各試験区のiPS細胞について、細胞表面におけるカルレティキュリンの存在量をFACSを用いて分析し、該分析結果に基づいてゲノム不安定なiPS細胞を選別した。即ち、上記カルレティキュリンを検出する蛍光色素(Phycoerythrin)の蛍光発色(励起波長: 488nm、最大蛍光波長: 575nm)の強度を分析し、該蛍光標識の蛍光発色強度に基づいてiPS細胞の選別(ゲノム不安定なiPS細胞の除去)を行った。なお、FACSとしては、オンチップバイオテクノロジー社製のOn-Chip Sortを用いた。

40

【0092】

上記抗カルレティキュリン抗体を用いて蛍光免疫染色を行った各試験区(抗カルレティキュリン抗体染色区)のiPS細胞(201B2又は201B7)について、上記カルレティキュリンを検出する蛍光色素(Phycoerythrin)の蛍光発色(励起波長: 488nm

50

、最大蛍光波長：575 nm)の強度をFACSを用いて分析(測定)した結果を、図7(201B2の結果)および図8(201B7の結果)に示す。図7および図8では、かかる試験区(抗カルレティキュリン抗体染色区)の結果を、「PE-Anti-Calreticulin antibody-stained cells」として示す。これらの図面は、各細胞の蛍光強度を示すヒストグラムであり、横軸に蛍光強度を示し、縦軸に細胞数を示す。

また、対照試験区(ネガティブコントロール区)として、蛍光免疫染色を行っていない各iPS細胞(Unstained cells)を、上記Phycoerythrinの蛍光強度測定と同様の条件で分析した。かかるUnstained cellsの分析結果を、上記抗カルレティキュリン抗体を用いて蛍光免疫染色を行った試験区の蛍光強度を示すヒストグラム(図7および図8)に重ねて示す。図7および図8中では、かかる試験区(ネガティブコントロール区)の結果を、「Unstained cells (Negative control)」として示す。

10

【0093】

上記ネガティブコントロール区において確認された蛍光強度ヒストグラムのピークは、該細胞の自家蛍光を検出したものと推察される。ここでは詳細なデータは示していないが、かかるネガティブコントロール区における蛍光強度ヒストグラムと、上記アイソタイプコントロールを用いて蛍光免疫染色を行った試験区の蛍光強度ヒストグラムとを比較したところ、201B2および201B7のいずれのiPS細胞においても、ヒストグラムのピークがほぼ同じであることを確認した。即ち、本試験で用いた抗カルレティキュリン抗体(抗カルレティキュリンモノクローナル[FM C 75]-Phycoerythrin抗体)は、iPS細胞に対する非特異的な抗原抗体反応が極めて少ないことを確認した。

20

【0094】

図7に示すように、ゲノム不安定な細胞を含むiPS細胞(201B2)の培養物について、抗カルレティキュリン抗体染色区の蛍光強度ヒストグラムと、該細胞のネガティブコントロール区の蛍光強度ヒストグラムとを比較すると、上記抗カルレティキュリン抗体染色区の蛍光発色強度ヒストグラムのピークトップの右側(即ち、高蛍光強度側)が、ネガティブコントロール区の蛍光強度ヒストグラムで確認されるピークよりもなだらかなり、位相がずれていることを確認した。即ち、抗カルレティキュリン抗体染色区の細胞中には、ネガティブコントロール区の細胞と比較して、蛍光強度が強い細胞集団が存在することを確認した。かかる蛍光強度の強い細胞集団は、カルレティキュリンを細胞表面に多く発現している細胞集団である。本試験に用いたFACSに搭載されるセルソータの機能を使用して、抗カルレティキュリン抗体染色区にかかる細胞中から上記ネガティブコントロール区の細胞よりも蛍光強度が強い細胞集団を選別することで、上記iPS細胞(201B2)の細胞培養物からゲノム不安定な細胞を除去することができる。

30

【0095】

一方で、図8に示すように、ゲノム安定なiPS細胞(201B7)は、抗カルレティキュリン抗体染色区の蛍光発色強度ヒストグラムが、該細胞のネガティブコントロール区において確認された蛍光強度ヒストグラムと比較して、ピーク位置およびピーク形状がほぼ同一であった。即ち、上記ゲノム安定なiPS細胞(201B7)の細胞表面でのカルレティキュリンの発現量は極めて低いことを確認した。

【0096】

40

以上の結果より、iPS細胞培養物中の各iPS細胞(典型的には細胞表面)におけるカルレティキュリン発現量を調べ、該カルレティキュリン発現量が所定レベルを上回ったiPS細胞をゲノム不安定性であると判別できることを確認した。また、iPS細胞のカルレティキュリンの発現量の程度に基づいて、対象のiPS細胞培養物中からゲノム不安定なiPS細胞を除去し得ることを確認した。上記iPS細胞のゲノム安定性の評価とゲノム不安定なiPS細胞の除去は、同一の標識(典型的には抗体の蛍光標識)を目印として同時に行うことができた。

なお、ここでは詳細なデータは示していないが、上記カルレティキュリンの発現量の程度を調べるより前にカルレティキュリン発現誘導ペプチド(即ちペプチドを有効成分として含むカルレティキュリン発現誘導剤)を該iPS細胞培養物中に添加し所定時間培養す

50

ることで、ゲノム不安定な細胞の細胞表面でのカルレティキュリンの発現を増大することができ、ゲノム不安定な i P S 細胞の除去を高精度かつ高い信頼性を実現し得ることを確認した。

【 0 0 9 7 】

< 実施例 6 : 顆粒剤の調製 >

上記サンプル 1 ~ 4 に係る合成ペプチド (カルレティキュリン発現誘導ペプチド) 5 0 m g と結晶化セルロース 5 0 m g 及び乳糖 4 0 0 m g とを混合した後、エタノールと水の混合液 1 m L を加え混練した。この混練物を常法に従って造粒し、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドを主成分とする顆粒剤 (顆粒状組成物) を得た。

【 産業上の利用可能性 】

10

【 0 0 9 8 】

上述のように、ここで開示される多能性幹細胞のゲノム安定性を評価する方法によると、多能性幹細胞 (典型的には i P S 細胞若しくは E S 細胞) のゲノム安定性を高効率かつ高い信頼性で判別することができるため、例えば、多能性幹細胞 (好ましくは i P S 細胞) の染色体検査に利用することができる。また、ここで開示されるゲノム不安定な多能性幹細胞の除去方法によると、ゲノム不安定と判別された多能性幹細胞が除去された多能性幹細胞培養物 (典型的には i P S 細胞培養物若しくは E S 細胞培養物) を提供 (製造) することができる。上記多能性幹細胞培養物は、例えば、再生医療目的に好適な医療用資材として利用することができる。また、ここで開示されるカルレティキュリン発現誘導ペプチドおよび該ペプチドを有効成分として含むカルレティキュリン発現誘導剤は、ゲノム不安定な多能性幹細胞 (典型的には i P S 細胞) におけるカルレティキュリン発現量を増大させる (あるいはカルレティキュリンの発現を誘導する) カルレティキュリン発現誘導活性を有しているため、例えば、上記多能性幹細胞のゲノム安定性評価方法、上記多能性幹細胞培養物からゲノム不安定な多能性幹細胞を除去する方法、ならびにゲノム不安定な多能性幹細胞を除去した多能性幹細胞培養物の製造方法に好適に利用することができる。

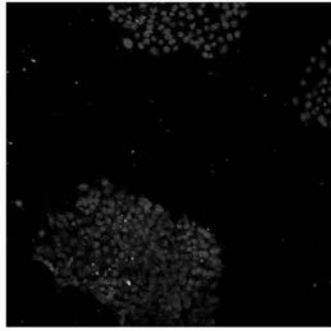
20

【 配列表フリーテキスト 】

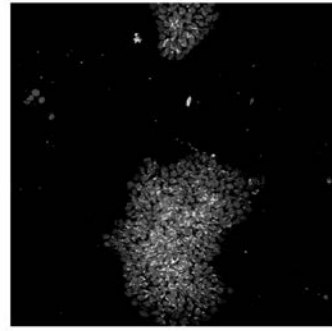
【 0 0 9 9 】

配列番号 1 ~ 1 3 合成ペプチド

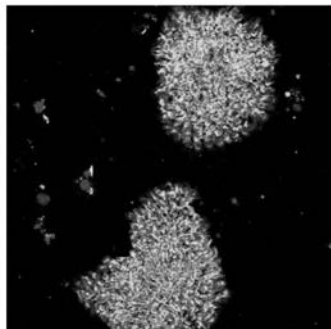
【図 1】



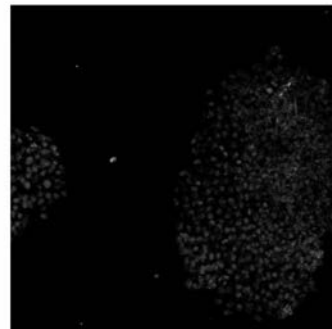
【図 2】



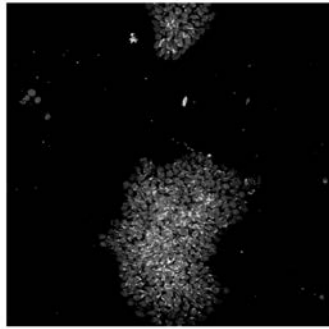
【図 3】



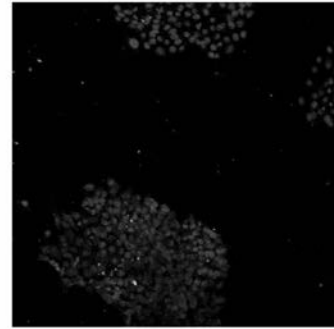
【図 4】



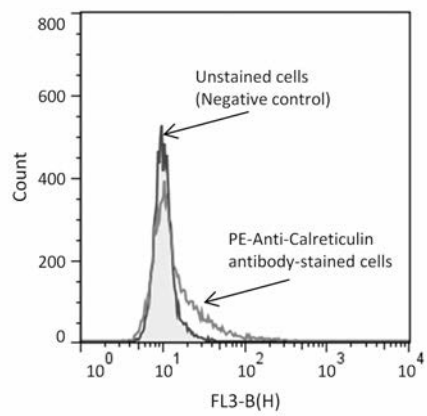
【 図 5 】



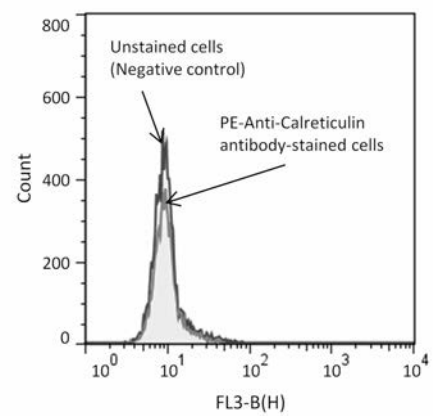
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

2015064715000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/078964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K7/06, C07K7/08, C07K19/00, C12N5/0735, C12Q1/02, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2012/087965 A1 (FATE THERAPAUETICS, INC.), 28 June 2012 (28.06.2012), claim 97; example 7 & JP 2014-501108 A & US 2014/0220681 A & EP 2655601 A	1-2, 9-12/ 3-8, 13-19
Y/A	JP 2012-223104 A (Olympus Corp., National University Corporation Kumamoto University), 15 November 2012 (15.11.2012), abstract; paragraph [0005] (Family: none)	1-2, 9-12/ 3-8, 13-19
Y/A	SENOVILLA L., et al., An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy, Science, 2012.09.28, Vol.337, No.6102, p.1678-1684, entire text	1-2, 9-12/ 3-8, 13-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 January 2015 (27.01.15)Date of mailing of the international search report
10 February 2015 (10.02.15)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/078964

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/028965 A2 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY), 13 March 2008 (13.03.2008), entire text & JP 2010-502681 A & US 2010/0016235 A1 & EP 1900375 A1	1-19

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 8 9 6 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06, C07K7/08, C07K19/00, C12N5/0735, C12Q1/02, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Caplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y/ A	WO 2012/087965 A1 (FATE THERAPAUETICS, INC.) 2012.06.28, 請求 項 97、実施例 7 & JP 2014-501108 A & US 2014/0220681 A & EP 2655601 A	1-2, 9-12/ 3-8, 13-19									
Y/ A	JP 2012-223104 A (オリンパス株式会社、国立大学法人 熊本大学) 2012.11.15, 要約、【0005】 (ファミリーなし)	1-2, 9-12/ 3-8, 13-19									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 27.01.2015		国際調査報告の発送日 10.02.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小金井 悟 電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 8 9 6 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	SENOVILLA L., et al., An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy, Science, 2012.09.28, Vol.337, No.6102, p.1678-1684, 全文	1-2, 9-12/ 3-8, 13-19
A	WO 2008/028965 A2 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 2008.03.13, 全文 & JP 2010-502681 A & US 2010/0016235 A1 & EP 1900375 A1	1-19

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ベイリー小林 菜穂子

日本国茨城県つくば市大久保 2 番 東亜合成株式会社内

(72) 発明者 吉田 善紀

日本国京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72) 発明者 蝶名林 和久

日本国京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA20 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS28 QS36

QX01 QX02

4B065 AA90X AC20 BD39 CA44 CA46

4C087 AA05 BB44 BB64 NA06 ZB22

4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 CA40 EA50

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	去除基因组不稳定的iPS细胞的方法和用于所述方法的合成肽		
公开(公告)号	JPWO2015064715A1	公开(公告)日	2017-03-09
申请号	JP2015545309	申请日	2014-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社 国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社 国立大学法人京都大学		
[标]发明人	吉田徹彦 ペイリー小林菜穂子 吉田善紀 蝶名林和久		
发明人	吉田 徹彦 ペイリー小林 菜穂子 吉田 善紀 蝶名林 和久		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12N5/076 C07K7/06 C07K7/08 C12N5/0735 C07K14/47 A61K35/545 A61P43/00		
CPC分类号	G01N33/6872 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/4705 C07K14/4725 C07K2319/01 C12Q1/6876 C12Q2600/158 G01N15/14 G01N15/1463 G01N2015/0065 G01N2015/1006 G01N2015/1488 G01N2015/149 G01N2333/4703 G01N2333/4706		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/02.ZNA C12N5/076 C07K7/06 C07K7/08 C12N5/0735 C07K14/47 A61K35/545 A61P43/00.107		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BD39 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA05 4C087/BB44 4C087/BB64 4C087/NA06 4C087/ZB22 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	安倍晋三诚		
优先权	2013225922 2013-10-30 JP		
其他公开文献	JP6490010B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

高效，高可靠性地评价多能干细胞的基因组稳定性的方法，以及评价通过该评价方法判定为多能干细胞的基因组不稳定的多能干细胞的培养 提供了从物质中去除的方法和适用于这些方法的合成肽。 本发明提供的方法包括制备目的多能干细胞培养物，检查培养物中多能干细胞钙网蛋白的表达水平，并表达钙网蛋白。 根据数量的程度区分干细胞的基因组稳定性或不稳定性。

