

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6821166号  
(P6821166)

(45) 発行日 令和3年1月27日(2021.1.27)

(24) 登録日 令和3年1月8日(2021.1.8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/073 (2010.01)	C 1 2 N 5/073 Z N A
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N 5/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/02
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 14 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2015-231156 (P2015-231156)	(73) 特許権者 598123138
(22) 出願日 平成27年11月26日 (2015.11.26)	学校法人 創価大学
(65) 公開番号 特開2017-93387 (P2017-93387A)	東京都八王子市丹木町1丁目236番
(43) 公開日 平成29年6月1日 (2017.6.1)	(74) 代理人 110002631
審査請求日 平成30年11月16日 (2018.11.16)	特許業務法人イイダアンドパートナーズ
特許法第30条第2項適用 掲載年月日:平成27年6月1日 データベースKAKEN 掲載アドレス: http://kaken.nii.ac.jp/d/p/25108514/2013/3/ja.en.html	(74) 代理人 100076439
	弁理士 飯田 敏三
	(74) 代理人 100161469
	弁理士 赤羽 修一
	(72) 発明者 西原 祥子
	東京都八王子市丹木町1-236 学校法人創価大学内
	(72) 発明者 三浦 太一
	東京都八王子市丹木町1-236 学校法人創価大学内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胚様体を外胚葉へと分化誘導する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

胚様体を外胚葉へと分化誘導する方法であって、プラズマ照射した培地を用いて胚様体を培養することを含み、該プラズマがプラズマ温度10～50の低温大気圧プラズマであり、該プラズマ照射の時間が30～100秒であり、該培地が白血球阻止因子を含まずウシ胎児血清を含む培地である、方法。

【請求項2】

前記胚様体が哺乳類の胚性幹細胞に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記プラズマが、ヘリウムガス、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素又は空気のプラズマである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記培養により前記胚葉体のWntシグナルを抑制し、これにより前記胚様体を外胚葉へと分化誘導する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記の外胚葉への分化誘導が神経細胞への分化誘導である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

外胚葉へと分化誘導された胚様体の製造方法であって、プラズマ照射した培地を用いて胚様体を培養することを含み、該プラズマがプラズマ温度10～50の低温大気圧プラ

ズマであり、該プラズマ照射の時間が30～100秒であり、該培地が白血病阻止因子を含まずウシ胎児血清を含む培地である、製造方法。

【請求項7】

前記胚様体が哺乳類の胚性幹細胞に由来する、請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】

前記プラズマが、ヘリウムガス、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素又は空気のプラズマである、請求項6又は7に記載の製造方法。

【請求項9】

前記培養により前記胚葉体のWntシグナルを抑制し、これにより前記胚様体を外胚葉へと分化誘導する、請求項6～8のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項10】

前記の外胚葉への分化誘導が神経細胞への分化誘導である、請求項6～9のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項11】

培地をプラズマ照射することを含む胚様体分化誘導用培地の製造方法であって、該プラズマがプラズマ温度10～50の低温大気圧プラズマであり、該プラズマ照射の時間が30～100秒であり、該培地が白血病阻止因子を含まずウシ胎児血清を含む培地であり、該培地が胚葉体を外胚葉へと分化誘導するために用いられる、胚様体分化誘導用培地の製造方法。

【請求項12】

前記胚様体が哺乳類の胚性幹細胞に由来する、請求項11に記載の胚様体分化誘導用培地の製造方法。

【請求項13】

前記プラズマが、ヘリウムガス、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素又は空気のプラズマである、請求項11又は12に記載の胚様体分化誘導用培地の製造方法。

【請求項14】

前記の外胚葉への分化誘導が神経細胞への分化誘導である、請求項11～13のいずれか1項に記載の胚様体分化誘導用培地の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胚様体を外胚葉へと分化誘導する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

プラズマの医療関連技術への応用研究が進められている。例えばプラズマ照射は、医療材料の表面を改質したり（表面処理技術）、細菌やウイルスを不活化したり（滅菌技術）するのに利用されている。また、プラズマはアレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介粘膜焼灼術や、消化器外科手術にも適用されるようになってきた。さらに、プラズマの熱的作用とは異なる作用を医療技術に応用する試みも進められている。例えば低温大気圧プラズマ（気体の温度が室温に近い大気圧プラズマ）は、止血作用、血管新生作用、臓器癒着防止作用、細胞増殖作用等、様々な作用を示すことが報告され、プラズマ照射を傷や疾患の治療に応用することが期待されている。

【0003】

胚性幹細胞（ES細胞）や誘導多能性幹細胞（iPS細胞）といった多能性幹細胞は、生体に存在する様々な細胞に分化する能力（分化多能性）を有した状態で長期にわたり継代培養可能な性質をもつ。したがって、細胞移植が有効な治療方法として期待される白血病、パーキンソン病等の治療への多能性幹細胞の適用が検討されている。

【0004】

10

20

30

40

50

多能性幹細胞を用いた細胞移植療法においては、多能性幹細胞を目的とする細胞又はその前駆細胞に分化誘導した上で移植する必要がある。例えば、パーキンソン病の治療にあたっては、多能性幹細胞を神経細胞又はその前駆細胞（外胚様）へと分化誘導し、これを患者に移植することになる。これまで多能性幹細胞の分化誘導には、主に遺伝子導入や遺伝子改変といった分子生物学的手法が報告されている（例えば、非特許文献1）。しかしこれらの手法は、分化誘導処理が煩雑で熟練した技術を要し、また、分化誘導された細胞を生体に適用した際の安全性も懸念される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】P l o s O N E D e c e m b e r 2 0 0 9 V o l . 4 I s s u e 1 2 e 8 2 6 2

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、従来の遺伝子導入や遺伝子改変といった分子生物学的手法を用いずに、多能性幹細胞を簡便に外胚葉へと分化誘導する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記課題に鑑み鋭意検討を行った。その結果、多能性幹細胞に由来する胚様体（Embryoid body：EB）を、プラズマ照射した培地を用いて培養することにより、胚様体の増殖を抑制することなく、胚様体を外胚葉へと特異的に分化誘導できることを見出した。

本発明はこれらの知見に基づき完成されるに至ったものである。

【0008】

本発明の上記課題は下記的手段により解決された。

〔1〕

胚様体を外胚葉へと分化誘導する方法であって、プラズマ照射した培地を用いて胚様体を培養することを含む、方法。

〔2〕

前記胚様体が哺乳類の胚性幹細胞に由来する、〔1〕に記載の方法。

〔3〕

前記プラズマが低温大気圧プラズマである、〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔4〕

前記プラズマが、ヘリウムガス、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素又は空気のプラズマである、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕

前記培養により前記胚様体のWntシグナルを抑制し、これにより前記胚様体を外胚葉へと分化誘導する、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕

前記の外胚葉への分化誘導が神経細胞への分化誘導である、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕

外胚葉へと分化誘導された胚様体の製造方法であって、プラズマ照射した培地を用いて胚様体を培養することを含む、製造方法。

〔8〕

前記胚様体が哺乳類の胚性幹細胞に由来する、〔7〕に記載の製造方法。

〔9〕

前記プラズマが低温大気圧プラズマである、〔7〕又は〔8〕に記載の製造方法。

〔10〕

10

20

30

40

50

前記プラズマが、ヘリウムガス、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素又は空気のプラズマである、〔 7 〕 ~ 〔 9 〕 のいずれかに記載の製造方法。

〔 1 1 〕

前記培養により前記胚葉体の W n t シグナルを抑制し、これにより前記胚様体を外胚葉へと分化誘導する、〔 7 〕 ~ 〔 1 0 〕 のいずれかに記載の製造方法。

〔 1 2 〕

前記の外胚葉への分化誘導が神経細胞への分化誘導である、〔 7 〕 ~ 〔 1 1 〕 のいずれかに記載の製造方法。

〔 1 3 〕

培地をプラズマ照射することを含む胚様体分化誘導用培地の製造方法であって、該培地が胚葉体を外胚葉へと分化誘導するために用いられる、胚様体分化誘導用培地の製造方法。

〔 1 4 〕

前記胚様体が哺乳類の胚性幹細胞に由来する、〔 1 3 〕 に記載の胚様体分化誘導用培地の製造方法。

〔 1 5 〕

前記プラズマが低温大気圧プラズマである、〔 1 3 〕 又は〔 1 4 〕 に記載の胚様体分化誘導用培地の製造方法。

〔 1 6 〕

前記プラズマが、ヘリウムガス、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素又は空気のプラズマである、〔 1 3 〕 ~ 〔 1 5 〕 のいずれかに記載の胚様体分化誘導用培地の製造方法。

〔 1 7 〕

前記の外胚葉への分化誘導が神経細胞への分化誘導である、〔 1 3 〕 ~ 〔 1 6 〕 のいずれかに記載の製造方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 〕

本発明の、胚様体を外胚葉へと分化誘導する方法によれば、遺伝子的人為的な改変を伴わずに、多能性幹細胞に由来する胚様体を外胚葉へと簡便に分化誘導することができる。また本発明の、外胚葉へと分化誘導された胚様体の製造方法によれば、遺伝子的人為的な改変を伴わずに、外胚葉へと分化誘導された胚様体を簡便に得ることができる。さらに本発明の胚様体分化誘導用培地の製造方法によれば、胚様体を外胚葉へと分化誘導する培地を簡便に得ることができる。すなわち本発明の胚様体分化誘導用培地の製造方法で得られる培地を用いることにより、遺伝子的人為的な改変を伴わずに、胚様体を外胚葉へと簡単に分化誘導することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 〕

【図 1】プラズマ照射した培地の製造の一例を示す概略図である。

【図 2】プラズマ照射していない培地を用いて胚様体を培養した際の胚様体の形態変化、プラズマ照射した培地を用いて胚様体を培養した際の胚様体の形態変化、及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地を用いて胚様体を培養した際の胚様体の形態変化を示す写真である。

【図 3】プラズマ照射した培地を用いて培養した胚様体が、コントロール培地を用いて培養した胚様体に比べて、培養 3 日目において中胚葉及び内胚葉への分化が抑制されていることを示すリアルタイム PCR 解析の結果である。\* は P < 0 . 0 5 を、\*\* は P < 0 . 0 1 を示す。

【図 4】プラズマ照射した培地を用いて培養した胚様体が、コントロール培地を用いて培養した胚様体に比べて、培養 1 2 日目において外胚葉へと分化誘導されていることを示すリアルタイム PCR 解析の結果である。\* は P < 0 . 0 5 を示す。

【図 5】プラズマ照射した培地を用いて培養した胚様体が、コントロール培地を用いて培養した胚様体に比べて、培養 1 2 日目において神経細胞系へと分化誘導されていることを

示すリアルタイムPCR解析の結果である。\*は $P < 0.05$ を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明について、その好ましい実施態様に基づき詳細に説明する。

本発明に用いる胚様体とは、多能性幹細胞を浮遊培養したときに形成されうる初期胚に似た構造をもつ球状の細胞塊である。胚様体は、多細胞生物の初期胚において、卵割によって形成される多数の細胞がしだいに規則的に配列してできる構造を有する。

本発明に用いる胚様体を形成する多能性幹細胞の種類に特に制限はないが、ES細胞又はiPS細胞であることが好ましく、より好ましくはES細胞である。前記多能性幹細胞は三胚葉性動物に由来する限り特に制限はない。例えば、哺乳類、鳥類等に由来する多能性幹細胞を用いることができ、なかでも哺乳類に由来する多能性幹細胞を好適に用いることができる。前記哺乳類としては、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット等が挙げられる。

上記多能性幹細胞は、通常の方法で調製することができる。また、寄託機関等に寄託されているセルライン等の分譲により得ることもできる。

【0012】

本発明に用いる胚様体は常法により多能性幹細胞から誘導することができる。例えば、多能性幹細胞を、細胞吸着能の低い培養皿で、leukemia inhibitory factor (LIF) 無しの培地で浮遊培養することで胚様体を得ることができる。かかる培地組成の一例として、例えば、ウシ胎児血清(FBS)を15質量%程度、ペニシリンないしストレプトマイシンを1質量%程度、2-メルカプトエタノールを0.1mM程度、非必須アミノ酸を0.1mM程度の濃度となるように添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を挙げることができる。但し、胚様体の形成に用いる培地は用いる多能性幹細胞の種類に応じて適宜に選択されるものであり、本発明に用いる培地は上記組成に何ら限定されるものではない。

胚様体を形成させるための温度、CO<sub>2</sub>濃度等は通常の方法を採用することができ、例えば、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で多能性幹細胞から胚様体を形成させることができる。

本発明に用いる胚様体の調製方法は上記に限定されず、胚様体を形成しうる方法であればいかなる方法で調製したものをを用いてもよい。

【0013】

本発明では、胚様体を外胚葉へと分化誘導するために、プラズマ照射した培地を用いて胚様体を培養する。このプラズマ照射した培地としては、上述した多能性幹細胞から胚様体を形成するための培地をプラズマ照射してなる培地を用いることができる。プラズマ照射効果をより高める観点から、FBSを除いた組成の培地をプラズマ照射し、使用時にFBSを添加して、本発明で規定するプラズマ照射した培地として用いることも好ましい。

本発明において「プラズマ照射した培地」の形態に特に制限はなく、通常は液体培地である。

【0014】

上記プラズマ照射条件は、胚様体を外胚葉へと分化誘導できれば特に制限はなく、この限りにおいて既存のあらゆるプラズマ照射条件を採用することができる。このプラズマ照射により生じた活性種(反応性成分)が胚様体に作用し、胚様体の外胚葉への特異的な分化が誘導されるものと推定される。胚様体を外胚葉へとより効率的に分化誘導する観点から、低温大気圧プラズマ(低温APP)を照射することが好ましい。低温APPはプラズマ照射のツールであり、生きた細胞の処理(組織殺菌、止血(血液凝固)、血管新生、傷の治療、腫瘍除去等)等に用いられている。

【0015】

低温APPを照射して「プラズマ照射した培地」を製造する方法の一例を図1に示す。図1に示す形態では、石英セル内を流通させたヘリウム(He)ガスにパルス状高電圧を付与し、大気圧下でプラズマ放電し、プラズマジェットを培地に照射する。このプラズマ

ジェットシステムの詳細は、Miura et al. 「Proliferation assay of mouse embryonic stem (ES) cells exposed to atmospheric-pressure plasmas at room temperature」 J. Phys. D: Appl. Phys. vol. 47, 2014, 445402 に記載され、かかるシステムを本発明におけるプラズマ照射に好適に用いることができる。

低温大気圧プラズマにおいて、照射されるプラズマの温度は10～50 が好ましく、20～30（室温程度）がより好ましい。

また、プラズマ照射時間は、外胚葉分化へと誘導する活性種を十分に生じさせるために、30秒以上とすることが好ましく、40秒以上とすることがより好ましく、50秒以上とすることがさらに好ましい。また、照射時間が長すぎると培地のpHが大きく変化するため、プラズマ照射時間は通常は100秒以下とし、90秒以下とすることが好ましく、80秒以下とすることがより好ましく、70秒以下とすることがさらに好ましい。

上記プラズマの種類は、本発明の効果を奏する限り特に制限はなく、Heガスの他、例えば、アルゴンガス、ネオンガス、キセノンガス、酸素、窒素、空気等のプラズマを広く用いることができる。

#### 【0016】

本発明において「プラズマ照射した培地を用いて胚葉体を培養する」には、予めプラズマ照射した培地（プラズマ照射される「培地」は上述した多能性幹細胞から胚様体を形成するための培地である）を調製し、この培地中に多能性幹細胞ないし胚様体を移して培養する形態、及び、胚様体を培養している培地（この「培地」は上述した多能性幹細胞から胚様体を形成するための培地である）を、胚様体ごとプラズマ照射し、そのまま培養を継続する形態が含まれる。胚様体のプラズマ照射によるダメージをより確実に回避する観点から、予めプラズマ照射した培地を調製し、この培地中に多能性幹細胞ないし胚葉体を移して培養する形態が好ましい。

胚様体は胚様体形成0日目（多能性幹細胞を、上述した多能性幹細胞から胚様体を形成するための培地に移して浮遊培養を開始してから0日目を意味する。この「0日目」は、多能性幹細胞を上述した多能性幹細胞から胚様体を形成するための培地に移して浮遊培養を開始した時点から、10時間（好ましくは5時間、さらに好ましくは2時間）を経過するまでの間を意味する。）から、プラズマ照射した培地で培養することが好ましい。

#### 【0017】

培地にプラズマを照射すると、反応性酸素種や反応性窒素種等、多くの活性種が生じることが知られている。そしてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は培地のプラズマ照射で生じる主要な活性種の1つである。

しかし、後述する実施例に示されるように、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した培地中で胚様体を培養した場合、培養後に内胚葉及び中胚葉への分化が抑制されず、胚様体の外胚葉への特異的な分化を誘導することができない。すなわち、プラズマ照射により生じた多種多様な活性種の複合的な作用によりはじめて、胚様体を外胚葉へと特異的に分化させることが可能になる。

#### 【0018】

プラズマ照射した培地で培養した胚様体は、後述する実施例に示される通り、培養後数日でWntシグナルが抑制される。Wntシグナルは中胚葉ないし内胚葉への分化を促進することが知られている。すなわち、胚様体をプラズマ照射した培地で培養することにより、胚様体の中胚葉ないし内胚葉への分化を効果的に抑制することができ、結果、外胚葉への分化を特異的に誘導することができる。また、プラズマ照射した培地で胚葉体を培養することにより、後述する実施例に示されるように培養後10日以上経過した段階では神経細胞マーカーの発現も有意に高められる。すなわち、胚様体をプラズマ照射した培地中で培養することにより、胚様体を神経細胞へと効率的に分化誘導することが可能となる。なお、本発明において「神経細胞」とは、神経細胞及び神経細胞の前駆細胞の双方を含む

意味に用いる。

【実施例】

【0019】

以下、実施例に基づいて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施形態に限定されるものではない。

【0020】

[プラズマ照射システム]

図1に示すシステムにより24ウェル型プレート内の培地に対して、Heガスのプラズマ(低温大気圧プラズマ)を照射した。プラズマ照射の具体的な条件を下記に示す。

<プラズマ照射条件>

電源電極(Powered electrode)にかけたPeak to - peak voltage: 10kV

パルス周波数: 27kHzの正弦波

Heガスの流速: 約2リットル/分

Heガスが流通する石英チューブの内径: 1.5mm

プラズマの中性ガス温度: 室温(約25℃)

24ウェル型プレートの最上面とプラズマシステムの最下端との距離: 5.5mm

1ウェル中の培地量: 1mL

プラズマ照射時間: 60秒

【0021】

[細胞培養と胚様体の形成]

多能性幹細胞として、マウスES細胞を用いた。具体的には、R1セルライン(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993)8424-8428に記載、自然科学研究機構 生理学研究所 分子神経生理研究部門 より供与)を使用した。このR1セルラインは、1000U/mLの濃度でLIF(ケミコン社製)を加えたESC培地(15質量%のFBS(Hyclone社製)、1質量%のペニシリン/ストレptomycin(Gibco社製)、0.1mMの2-メルカプトエタノール(Gibco社製)及び0.1mMの非必須アミノ酸(Gibco社製)を添加したDMEM)中において、10µg/mLのマイトマイシンC(シグマ社製)で不活化したマウス線維芽細胞(MEFs)上で維持した。

胚様体の形成を誘導するために、上記マウスES細胞を $3.0 \times 10^5$ 細胞ずつ、3.5mm Low Cell Binding dishes(住友ベークライト社製)に移し、LIFを含まない上記のESC培地(コントロール)、LIFを含まない後述するプラズマ照射培地(実施例)、及び、LIFを含まない後述するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地(比較例)で浮遊培養した。本発明においては、胚様体の形成を誘導するための培地中で多能性幹細胞の浮遊培養の開始した時点(多能性幹細胞培養後0日目)とする。したがって、例えば、「胚様体形成から1日後」とは、多能性幹細胞について上記の浮遊培養を開始してから1日後を意味する。

【0022】

[プラズマ照射培地の調製]

1mLのESC培地(FBS不含、LIF不含)を24ウェル型プレートの各ウェルに入れた。この24ウェル型プレートの培地に対し、上記プラズマ照射システムによりプラズマを照射した。プラズマ照射後、培地を直ちにマイクロチューブに移して4℃で保存した。胚様体形成用培地として用いる際には、FBSを添加してから使用した。

【0023】

[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地の調製]

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(関東化学社製)を終濃度45µMとなるように、プラズマ照射していないESC培地(FBS不含、LIF不含)に添加し、4℃で保存した。胚様体形成用培地として用いる際には、FBSを添加してから使用した。

【0024】

## [リアルタイムPCR分析]

胚様体のトータルRNAは、TRIzol（登録商標）試薬（インビトロジェン社製）を用いて、使用説明書に従って抽出した。単離したRNAはジエチルピロカーボネート処理した水に溶解し、使用時までには-80℃で保存した。

RNA濃度はUVスペクトルフォトメーターを用いて波長260nmの吸光度に基づき決定した。

cDNAは、オリゴ-dTプライマー（インビトロジェン社製）及びSuperscript II First Strand Synthesis Kit（インビトロジェン社製）を用いてトータルRNAを逆転写して得た。

リアルタイムPCRは、ABI PRISM（登録商標）7700 Sequence Detection System（アプライドバイオシステムズ社製）及びSYBR Green Master Mix（ロシュ社製）を用いて行った。

胚様体の遺伝子発現を調べるために、リアルタイムPCRに用いたプライマーセットについては後述する。

## 【0025】

## [結果]

## &lt;胚様体の細胞増殖に対するプラズマ照射培地の影響&gt;

上記マウスES細胞を、胚様体形成用培地としてプラズマ照射していないESC培地（含FBS、LIF不含、「コントロール培地」という）、上述したプラズマ照射培地（含FBS）、及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地（含FBS）で12日間培養し、その細胞増殖を調べた。なお、12日間の培養期間中、2日ごと（培養開始から2日後、4日後、6日後、8日後及び10日後）に培地を新しいものと交換した。

培養後2.5日後、4日後、8日後、及び12日後における胚様体の形態を顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。図2に示されるように、胚様体の形態（外観）の培地の違いによる変化は認められなかった。

## 【0026】

また、培養後2.5日後の胚様体について、Spry2（FGF4シグナルのターゲット遺伝子）とFgf4（FGFリガンド）の発現量をリアルタイムPCRで調べた結果、コントロール培地で培養した胚様体に比べて、プラズマ照射培地で培養した胚様体において、発現量が有意に上昇していた。また、培養後2.5日後の胚様体において、FGF4の刺激により活性化されることが知られているリン酸化Erk1/2のタンパク質の発現量も有意に上昇していた。これらの事実は、プラズマ照射培地で胚様体を培養することにより、FGF4シグナルが活性化され、胚様体のエピブラストへの分化が促進されていることを示す。

## 【0027】

## &lt;プラズマ照射培地は胚様体の中胚葉及び内胚葉への分化を抑制した&gt;

多能性幹細胞は胚様体形成用培地で培養を開始してから1~2.5日程度でエピブラスト（将来、体のすべて組織を構築する未分化な細胞集団）の形態となり、次いでエピブラストにおいてはまず、内胚葉あるいは中胚葉への分化が開始される。エピブラストの外胚葉への分化は、内胚葉あるいは中胚葉への分化開始時期よりも遅れて開始する。上記の胚様体培養後3日目において、中胚葉マーカー又は内胚葉マーカーとして知られる下記遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより調べた。

T : 中胚葉マーカー  
 Mixl1 : 中胚葉マーカー  
 Foxa2 : 内胚葉マーカー  
 Gata6 : 内胚葉マーカー

（使用したプライマーセットの詳細は後述する）

## 【0028】

結果を図3に示す。図3に示される通り、プラズマ照射培地で培養した胚様体は、コントロール培地で培養した胚様体に比べて、中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーのいずれの



発現も大きく抑制されていることがわかった。一方、 $H_2O_2$ 添加培地で培養した胚様体では、中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーの発現抑制は全く認められず、むしろ発現量が増加する傾向が認められた。これらの結果から、プラズマ照射培地を用いて胚様体を培養することにより、胚様体を外胚葉へと特異的に分化誘導できることがわかった。

#### 【0029】

胚様体の中胚葉や内胚葉への分化には、Wntシグナルが関与しており、Wntシグナルが働くことで胚様体の中胚葉や内胚葉への分化が促進されることが知られている。そこで、上記の胚様体培養後3日目において、Wntシグナルに関連する遺伝子の発現量についても調べた。具体的には、下記遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより調べた。

Axin2	: Wntシグナルのターゲット遺伝子	10
Ccnd1	: Wntシグナルのターゲット遺伝子	
Wnt3a	: Wntリガンド	
Lrp5	: Wntシグナルのレセプター	
Lrp6	: Wntシグナルのレセプター	
Frizzled1 (Fzd1)	: Wntシグナルのレセプター	
Frizzled5 (Fzd5)	: Wntシグナルのレセプター	

(使用したプライマーセットの詳細は後述する)

#### 【0030】

結果を図3に示す。図3に示されるように、プラズマ照射培地で培養した胚様体は、コントロール培地で培養した胚様体に比べて、Wntシグナルのターゲット遺伝子と、Wntレセプターの発現量がいずれも大きく低下していた。一方、Wntリガンド(Wnt3a)の発現量には変化が認められなかった。これらの結果から、プラズマ照射培地を用いることにより、胚様体のWntレセプターの発現が抑えられ、これにより内胚葉や中胚葉への分化が抑制され、上述したFGF4シグナルの活性化と相俟って、外胚葉への分化を特異的に誘導できることが示された。なお、 $H_2O_2$ 添加培地で培養した胚様体では、Wntシグナルのターゲット遺伝子やWntレセプターの発現抑制は認められず、内胚葉や中胚葉への分化が抑制されていないことも示された。

#### 【0031】

<プラズマ照射培地は胚様体の外胚葉への分化を誘導した>

上記の胚様体培養後12日目において、外胚葉マーカーとして知られる下記遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより調べた。

Pax6	: 外胚葉マーカー	30
------	-----------	----

(使用したプライマーセットの詳細は後述する)

#### 【0032】

結果を図4に示す。図4に示されるように、プラズマ照射培地で培養した胚様体は、コントロール培地で培養した胚様体に比べて、外胚葉マーカーの発現量が大きく高められていることがわかった。

#### 【0033】

胚様体の外胚葉への分化には、FGF4シグナルが関与することが知られている。そこで、上記の胚様体培養後12日目において、FGF4シグナルに係る下記遺伝子の発現量について調べた。具体的には、下記遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより調べた。

Spry2	: FGF4シグナルのターゲット遺伝子	40
Fgf4	: FGFリガンド	

(使用したプライマーセットの詳細は後述する)

#### 【0034】

結果を図4に示す。図4の結果から、胚様体培養後12日目においても、プラズマ照射培地で培養した胚様体は、コントロール培地で培養した胚様体に比べてFGF4シグナルが高められていることがわかった。

#### 【0035】

<プラズマ照射培地は胚様体の神経細胞系への分化を誘導した>

上記の胚様体培養後 12 日目において、神経細胞マーカーとして知られる *Tubb3* の発現量をリアルタイム PCR により調べた。結果を図 5 に示す。

図 5 に示されるように、プラズマ照射培地で培養した胚様体は、コントロール培地で培養した胚葉体に比べて *Tubb3* の発現量が有意に増加しており、神経細胞系への分化が誘導されていることが示された。

【 0 0 3 6 】

以下、上記実施例におけるリアルタイム PCR で用いたプライマーセットを下表に示す。

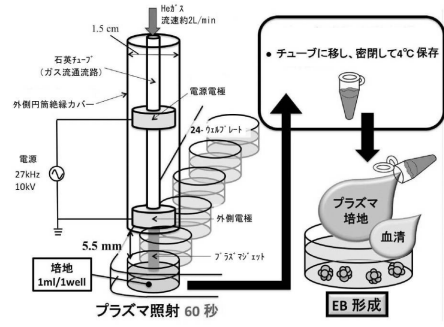
【 0 0 3 7 】

【表 1】

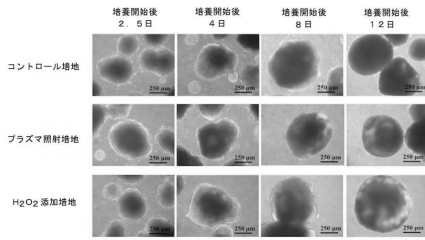
表 1

遺伝子マーカー	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>T</i>	5' -TGCTGCAGTCCCATGATAACTG-3' (配列番号 1)	5' -ATGACTCACAGGCAGCATGCT-3' (配列番号 2)
<i>Mix11</i>	5' -GCACGTGTTTCAGCTCGGAGCAGC-3' (配列番号 3)	5' -AGTCATGCTGGGATCCGGAACGTGG-3' (配列番号 4)
<i>Foxa2</i>	5' -AGCCGTGAAGATGGAAGGG-3' (配列番号 5)	5' -CTCCGCTAGTAGCTGCTCC-3' (配列番号 6)
<i>Gata6</i>	5' -CCCCTCATCAAGCCACAGAA-3' (配列番号 7)	5' -GTGACAGTTGGCACAGGACAGT-3' (配列番号 8)
<i><math>\beta</math>-actin</i>	5' -GCTCTGGCTCCTAGCACCAT-3' (配列番号 9)	5' -GCCACCGATCCACACAGAGT-3' (配列番号 10)
<i>Axin2</i>	5' -GGGAGCAGTTTTGTGGCAGCA-3' (配列番号 11)	5' -AGGGTCTGGGTAATGGGTGAG-3' (配列番号 12)
<i>CcnD1</i>	5' -GCTACCGCACAACGCATT-3' (配列番号 13)	5' -GCAGGCACGGAGGCAG-3' (配列番号 14)
<i>Wnt3a</i>	5' -CTGCCATGAACCGTCACAAC-3' (配列番号 15)	5' -CATTTGCACTTGAGGTGCATGT-3' (配列番号 16)
<i>Lrp5</i>	5' -GTGTTTACACTACAGCTGG-3' (配列番号 17)	5' -TAGGACAAGTCCGGGCTG-3' (配列番号 18)
<i>Lrp6</i>	5' -GCAAGCTTCTGGGCTGACT-3' (配列番号 19)	5' -AACACGGTCAGGCCACA-3' (配列番号 20)
<i>Fzd1</i>	5' -AACTTTGTGCCGAAGCACTC-3' (配列番号 21)	5' -GGTCTGGTTGTACGGATGT-3' (配列番号 22)
<i>Fzd5</i>	5' -GGCATCTTACCCTGCTCTA-3' (配列番号 23)	5' -TTCCTCTCCAAGCCACTCTG-3' (配列番号 24)
<i>Pax6</i>	5' -AACCTGGCTAGCGAAAAGCA-3' (配列番号 25)	5' -CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA-3' (配列番号 26)
<i>Spry2</i>	5' -GGTCTCGGAGCAGTACAAGG-3' (配列番号 27)	5' -GTAGGCATGCAGACCAAT-3' (配列番号 28)
<i>Fgf4</i>	5' -CGGCTCTACTGCAACGTG-3' (配列番号 29)	5' -CGGAGAGAGCTCCAGAAGAC-3' (配列番号 30)
<i>Tubb3</i>	5' -ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG-3' (配列番号 31)	5' -ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG-3' (配列番号 32)

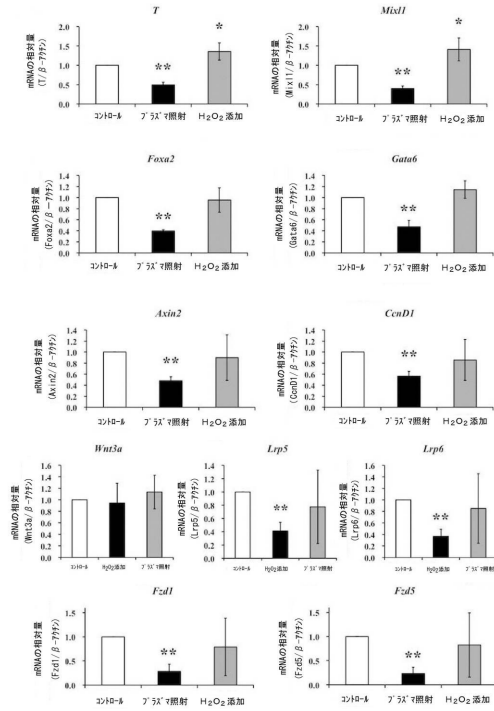
【図 1】



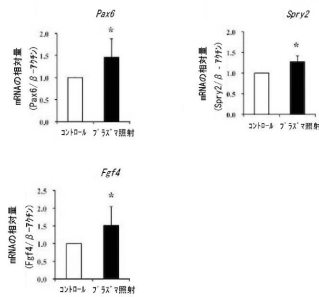
【図 2】



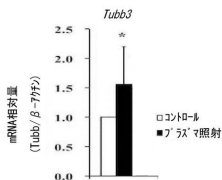
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006821166000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 浜口 智志

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

審査官 林 康子

(56)参考文献 特開2016-174553(JP, A)

Miura T et al, Proliferation assay of mouse embryonic stem (ES) cells exposed to atmospheric pressure plasmas at room temperature, J Phys D: Appl Phys, 2014年, 47, 44540  
2(12)

加藤奈緒、他、マウス胚発生におけるプラズマ照射培養液が与える影響の検討、日産婦誌、2015年 2月 1日、67・2、730(S496), P2318

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00~7/08

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

PubMed