(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116368218 A
(43)申请公布日 2023.06.30

(21)申请号 202180070010.0
(22)申请日 2021.08.17
(30)优先权数据
2020-138106 2020.08.18 JP
2021-075272 2021.04.27 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/030058 2021.08.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/039165 JA 2022.02.24
(71)申请人 东曹株式会社
地址 日本山口县
(72)发明人 门田纯平 今泉裕
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李恩华
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2006.01)

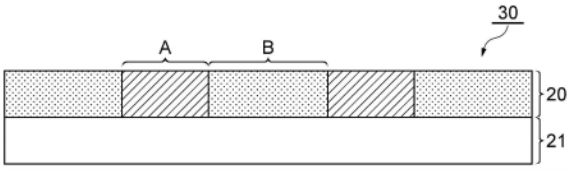
权利要求书3页 说明书31页
序列表1页 附图14页

(54)发明名称

分化诱导为多能干细胞的外胚层、中胚层和内胚层系细胞的方法

(57)摘要

本发明涉及分化诱导方法等，其特征在于，其为由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法，所述方法包括以下的(1-1)～(1-4)工序。(1-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上进行基质胶等的覆盖以及接种多能干细胞的工序。(A)具有细胞粘附性等的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。(B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性等的区域。(1-2)在未分化性维持培养基的存在下，对多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附于细胞培养基材上的多能干细胞聚集体的工序。(1-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养多能干细胞聚集体，形成拟胚体的工序。(1-4)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养拟胚体，形成外胚层系细胞聚集体的工序。



CN 116368218 A

1.一种分化诱导方法,其特征在于,其为由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法,所述方法包括以下的(1-1)～(1-4)工序:(1-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上,进行选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白组成的组中的单独一种或多种物质的覆盖以及接种多能干细胞的工序,(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5㎜^{2}的岛状的区域,(B)与所述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域;(1-2)在未分化性维持培养基的存在下,对在所述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,形成附着于细胞培养基材上的多能干细胞聚集体的工序;(1-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养所述(1-2)工序中所形成的多能干细胞聚集体,形成类胚体(拟胚体)的工序;(1-4)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养所述(1-3)工序中所形成的类胚体(拟胚体),形成外胚层系细胞聚集体的工序。

2.根据权利要求1所述的分化诱导方法,其特征在于,所述细胞培养基材在表面含有由亲水性高分子形成的层,(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理、电晕放电处理中的任一种、或通过它们的组合而使所述由亲水性高分子形成的层的一部分分解或改性的区域。

3.根据权利要求1或2所述的分化诱导方法,其特征在于,所述(1-3)工序中的分化诱导因子含有外胚层诱导因子、中胚层诱导因子和内胚层诱导因子。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的分化诱导方法,其特征在于,在所述(1-4)工序中形成的外胚层系细胞聚集体具有PAX6和SOX1。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的分化诱导方法,其特征在于,外胚层系细胞为神经干细胞或神经细胞。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的分化诱导方法,其特征在于,外胚层系细胞为运动神经细胞。

7.一种细胞的制造方法,其特征在于,其为由多能干细胞分化诱导为外胚层系细胞的细胞制造方法,所述方法包括以下的(1-1)～(1-4)工序:(1-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上,进行选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白组成的组中的单独一种或多种物质的覆盖以及接种多能干细胞的工序,(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5㎜^{2}的岛状的区域,(B)与所述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域;(1-2)在未分化性维持培养基的存在下,对在所述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,形成附着于细胞培养基材上的多能干细胞聚集体的工序;(1-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养所述(1-2)工序中所形成的多能干细胞聚集体,形成类胚体(拟胚体)的工序;(1-4)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养所述(1-3)工序中所形成的类胚体(拟胚体),形成外胚层系细胞聚集体的工序。

8.一种分化诱导方法,其特征在于,其为由多能干细胞分化诱导中胚层系细胞的方法,所述方法包括以下的(2-1)～(2-3)工序:(2-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上,进行选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白组成的组中的单独一种或多种物质的覆盖以及接种多能干细胞的工序,(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5㎜^{2}的岛状的区域,(B)与所述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域;(2-2)在未分化性维持培养基的存在下,对在所述(2-1)工序中接种的多

能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附在细胞培养基材上的类胚体(拟胚体)的工序；(2-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养所述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成中胚层系细胞聚集体的工序。

9.根据权利要求8所述的分化诱导方法，其特征在于，所述细胞培养基材在表面具有包含亲水性高分子的层，(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理和/或电晕放电处理而使所述包含亲水性高分子的层分解或改性的区域。

10.根据权利要求8或9所述的分化诱导方法，其特征在于，所述(2-1)工序的细胞接种密度为1.0×10^{2}～1.0×10^{6}个细胞/cm^{2}。

11.根据权利要求8～10中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，所述(2-2)工序中，培养类胚体(拟胚体)直至(A)区域的每单位面积的细胞数为1.0×10^{4}个细胞/cm^{2}以上。

12.根据权利要求8～11中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，所述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)的形状为岛状。

13.根据权利要求8～12中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，所述(2-3)工序中的分化诱导因子含有中胚层诱导因子。

14.根据权利要求13所述的分化诱导方法，其特征在于，中胚层诱导因子为选自由GSK3β抑制剂、骨形态发生蛋白和激活素组成的组中的单独一种或多种分化诱导因子。

15.根据权利要求8～14中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，所述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)具有中胚层标记物。

16.一种由多能干细胞向内胚层系细胞的分化诱导方法，其包括如下工序：

(3-1)实施如下操作的工序，在具有下述(A)区域和下述(B)区域的细胞培养基材中，以所述细胞培养基材的培养面的面积作为基准，以层粘连蛋白及其片段的总量成为1～100μg/cm^{2}的方式添加包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物，以及接种多能干细胞，

(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域，

(B)与所述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域；

(3-2)在未分化性维持培养基的存在下，对在工序(3-1)中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附于所述细胞培养基材的培养面上的拟胚体的工序；及

(3-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，在粘附于细胞培养基材的培养面上的状态下培养工序(3-2)中所形成的拟胚体，进行分化诱导而形成内胚层系细胞的聚集体的工序。

17.根据权利要求16所述的分化诱导方法，其特征在于，工序(3-3)中分化诱导而得的内胚层系细胞表达作为内胚层标记物的SOX17。

18.根据权利要求16或17所述的分化诱导方法，其特征在于，工序(3-3)中分化诱导而得的内胚层系细胞为肠上皮细胞。

19.根据权利要求18所述的分化诱导方法，其特征在于，工序(3-3)中分化诱导而得的肠上皮细胞具有作为吸收上皮细胞标记物的VIL1。

20.根据权利要求16～19中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，所述细胞培养基材在表面具有含有亲水性高分子的层，

所述(A)区域是通过选自由等离子体处理、紫外线处理和电晕放电处理组成的组中的

至少1种处理而使所述含有亲水性高分子的层的一部分分解或改性的区域。

21.根据权利要求16～20中任一项所述的分化诱导方法,其特征在于,工序(3-1)中,接种多能干细胞时的细胞密度以所述细胞培养基材的培养面的面积作为基准为1.0×10^{2}～5.0×10^{5}个细胞/cm^{2}。

22.根据权利要求16～21中任一项所述的分化诱导方法,其特征在于,所述聚集体的形状为半球状。

23.根据权利要求16～22中任一项所述的分化诱导方法,其特征在于,所述分化诱导因子为选自由TGF-β抑制剂、ATP竞争性抑制剂和GSK3抑制剂组成的组中的至少1种。

24.一种分化诱导为三胚层系细胞的试剂盒,其具备具有下述(A)区域和下述(B)区域的细胞培养基材,

(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域

(B)与所述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。

分化诱导为多能干细胞的外胚层、中胚层和内胚层系细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及:分化诱导效率和培养操作性优异的、由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法和制造方法、由多能干细胞分化诱导为中胚层系细胞的方法、以及使多能干细胞分化诱导为内胚层系细胞的方法。

背景技术

[0002] 针对肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)等神经退行性疾病,对使用由人工多能干细胞(iPS细胞)分化诱导的神经细胞的药物研发的兴趣日益高涨。另外,对使用由人工多能干细胞(iPS细胞)分化诱导的肝脏细胞、小肠细胞、胰腺细胞等内胚层系细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞或血管内皮细胞的药物研发的兴趣也日益高涨。通过充分利用疾病患者来源iPS细胞,从而可期待目前困难的疾病机理的阐明、药物研发研究和再生医疗的发展。通常,在分化诱导为神经细胞的过程中,经历被称为类胚体(拟胚体)的多能干细胞聚集体的形成工序、被称为神经球的神经干细胞聚集体的形成工序而分化诱导为各外周神经细胞。通常,在分化诱导为中胚层系的过程中,经历被称为类胚体(拟胚体)的多能干细胞聚集体的形成工序而分化诱导为各中胚层细胞来源的组织。通常,在分化诱导为内胚层系细胞的过程中,经历被称为拟胚体的多能干细胞的聚集体的形成而分化诱导为各内胚层系细胞来源的组织。另外,已知在分化诱导为目标细胞的过程中类胚体(拟胚体)的状态对分化路径等细胞命运产生很大影响,如何能够有效地制作均质的类胚体(拟胚体)成为课题。

[0003] 在现有的方法中,利用悬滴法(Hanging drop)培养(例如,专利文献1)、非粘附表面(Non-adhesive surface)培养(例如,专利文献2)等悬浮培养法制作了类胚体(拟胚体)和神经球(例如,专利文献3)。

[0004] 作为利用了悬浮培养法的其他方法,有利用如下方法:通过在表面具有微细凹凸结构的细胞非粘附性的基材上接种细胞,使细胞沉淀,从而形成与凹凸尺寸相应的细胞聚集体(例如,专利文献4)。

[0005] 专利文献5记载了:能够有效地形成细胞的球状体、且能够形成细胞的存活率高、尺寸均质且具有任意形状的球状体的细胞培养基材、和该细胞培养基材的制造方法、使用了该细胞培养基材的球状体内部的细胞存活率优异的球状体制造方法。

[0006] 专利文献6记载了:将ES细胞接种于覆盖了0.1%人重组I型胶原蛋白肽或玻连蛋白的基材上,进行分化诱导,制作了进行类似于肠的蠕动运动的类器官。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2008/001938号

[0010] 专利文献2:国际公开第2017/123791号

[0011] 专利文献3:日本特开2002-291469号公报

[0012] 专利文献4:国际公开第2018/123663号

[0013] 专利文献5:日本特开2020-62009号公报

[0014] 专利文献6:日本特开2019-14号公报

发明内容

[0015] 发明要解决的问题

[0016] 专利文献1～3中记载的培养方法中,所形成的聚集体的尺寸不均匀,因此存在个体之间在分化诱导的效率方面容易产生差异的问题。另外,由于三维地配置尺寸不同的聚集体,因此也有局部发生营养不足的担心。专利文献4中记载的方法中,由于聚集体未固定化于基材表面,因此存在培养基更换时一部分聚集体与培养基一同被去除等需要对培养操作熟练的课题。另外,在基材的性质方面,由于难以实现更换全部培养基,因此容易发生分化诱导因子等营养不足,有分化诱导效率差的担心。专利文献6中记载的培养方法中,所形成的类器官在分化诱导开始起约30天后从基材上自然剥离。若类器官剥离,则存在培养操作、用于细胞功能评价的免疫染色时的处理困难的课题。

[0017] 本发明的目的在于,提供:分化诱导效率和培养操作性优异的、由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法和制造方法。

[0018] 本发明的目的还在于,提供:分化诱导效率和培养操作性优异的、由多能干细胞分化诱导为中胚层系细胞的方法。

[0019] 本发明的目的还在于,提供:培养基更换和细胞观察等培养操作的简便性优异、且免疫染色和分泌物测定试验等细胞功能评价时的操作性也优异的、由多能干细胞分化诱导为内胚层系细胞的方法。

[0020] 用于解决问题的方案

[0021] 本发明人等发现:通过在具有形成为岛状的细胞粘附区域的细胞培养基材上接种多能干细胞,而形成粘附在细胞培养基材上的类胚体(拟胚体),通过对粘附状态的类胚体(拟胚体)进行分化诱导,从而能够解决前述课题,以至完成了本发明。

[0022] 即本发明的一方式为由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法和外胚层系细胞的制造方法,所述方法包括以下的(1-1)～(1-4)工序。

[0023] ＜1＞一种分化诱导方法,其特征在于,其为由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法,所述方法包括以下的(1-1)～(1-4)工序:(1-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上,进行选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白组成的组中的单独一种或多种物质的覆盖以及接种多能干细胞的工序。(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。(B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。(1-2)在未分化性维持培养基的存在下,对在前述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,形成附着于细胞培养基材上的多能干细胞聚集体的工序。(1-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-2)工序中所形成的多能干细胞聚集体,形成类胚体(拟胚体)的工序。(1-4)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-3)工序中所形成的类胚体(拟胚体),形成外胚层系细胞聚集体的工序。

[0024] ＜2＞根据＜1＞所述的分化诱导方法,其特征在于,前述细胞培养基材在表面含有由亲水性高分子形成的层,(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理、电晕放电处理中

的任一种、或通过它们的组合而使前述由亲水性高分子形成的层的一部分分解或改性的区域。

[0025] ＜3＞根据＜1＞或＜2＞所述的分化诱导方法，其特征在于，前述(1-3)工序中的分化诱导因子含有外胚层诱导因子、中胚层诱导因子和内胚层诱导因子。

[0026] ＜4＞根据＜1＞～＜3＞中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，在前述(1-4)工序中形成的外胚层系细胞聚集体具有PAX6和SOX1。

[0027] ＜5＞根据＜1＞～＜4＞中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，外胚层系细胞为神经干细胞或神经细胞。

[0028] ＜6＞根据＜1＞～＜5＞中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，外胚层系细胞为运动神经细胞。

[0029] ＜7＞一种细胞的制造方法，其特征在于，其为由多能干细胞分化诱导为外胚层系细胞的细胞制造方法，所述方法包括以下的(1-1)～(1-4)工序：(1-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上，进行选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白组成的组中的单独一种或多种物质的覆盖以及接种多能干细胞的工序。(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。(B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。(1-2)在未分化性维持培养基的存在下，对在前述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成附着于细胞培养基材上的多能干细胞聚集体的工序。(1-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-2)工序中所形成的多能干细胞聚集体，形成类胚体(拟胚体)的工序。(1-4)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-3)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成外胚层系细胞聚集体的工序。

[0030] 本发明包括以下所示的[1]～[8]的各方式。

[0031] [1]一种分化诱导方法，其特征在于，其为由多能干细胞分化诱导中胚层系细胞的方法，所述方法包括以下的(2-1)～(2-3)工序：(2-1)在具有下述(A)和(B)这2个区域的细胞培养基材上，进行选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白和胶原蛋白组成的组中的单独一种或多种物质的覆盖以及接种多能干细胞的工序。

[0032] (A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。

[0033] (B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。(2-2)在未分化性维持培养基的存在下，对在前述(2-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附在细胞培养基材上的类胚体(拟胚体)的工序。(2-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成中胚层系细胞聚集体的工序。

[0034] [2]根据[1]所述的分化诱导方法，其特征在于，前述细胞培养基材在表面具有包含亲水性高分子的层，(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理和/或电晕放电处理而使前述包含亲水性高分子的层分解或改性的区域。

[0035] [3]根据[1]或[2]所述的分化诱导方法，其特征在于，前述(2-1)工序的细胞接种密度为1.0×10^2～1.0×10^6个细胞/cm^2。

[0036] [4]根据[1]～[3]中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，前述(2-2)工序中，培养类胚体(拟胚体)直至(A)区域的每单位面积的细胞数为1.0×10^4个细胞/cm^{2}以上。

[0037] [5]根据[1]～[4]中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)的形状为岛状。

[0038] [6]根据[1]～[5]中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，前述(2-3)工序中的分化诱导因子含有中胚层诱导因子。

[0039] [7]根据[6]所述的分化诱导方法，其特征在于，中胚层诱导因子为选自由GSK3β抑制剂、骨形态发生蛋白(BMP)和激活素组成的组中的单独一种或多种分化诱导因子。

[0040] [8]根据[1]～[7]中任一项所述的分化诱导方法，其特征在于，前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)具有中胚层标记物。

[0041] 本发明的一方式涉及一种使多能干细胞分化诱导为内胚层系细胞的方法，其包括如下工序：

[0042] (3-1)实施如下操作的工序，在具有下述(A)区域和下述(B)区域的细胞培养基材中，以前述细胞培养基材的培养面的面积作为基准，以层粘连蛋白及其片段的总量成为1～100μg/cm^2的方式添加包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物，以及接种多能干细胞；

[0043] (A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^2的岛状的区域

[0044] (B)与(A)区域相邻、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域

[0045] (3-2)在未分化性维持培养基的存在下，对在工序(3-1)中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附于细胞培养基材的培养面上的拟胚体的工序；及

[0046] (3-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，在粘附于细胞培养基材的培养面上的状态下培养工序(3-2)中所形成的拟胚体，进行分化诱导而形成内胚层系细胞的聚集体的工序。

[0047] 本发明的一方式为一种分化诱导为三胚层系细胞的试剂盒，其具备具有下述(A)区域和下述(B)区域的细胞培养基材。

[0048] (A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^2的岛状的区域

[0049] (B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域发明的效果

[0050] 根据本发明，可以提供分化诱导效率和培养操作性优异的、由多能干细胞分化诱导外胚层系细胞的方法和分化诱导试剂盒。在固定于具有前述的(A)和(B)区域的细胞培养基材上的培养系统中分化诱导的类胚体(拟胚体)能够维持任意的形状(类胚体(拟胚体)的直径、类胚体(拟胚体)的长径比)，而且分化诱导因子的浓度梯度的影响也低，因此能够同步各细胞的分化进程。另外，通过使细胞聚集体在无饲养层和固定于细胞培养基材的培养系统中进行分化诱导，从而能够降低夹杂物的混入。

[0051] 根据本发明，可以提供分化诱导效率和培养操作性优异的、由多能干细胞分化诱导为中胚层系细胞的方法和分化诱导试剂盒。

[0052] 根据本发明，可以提供培养基更换和细胞观察等培养操作的简便性优异、且免疫染色和分泌物测定试验等细胞功能评价时的操作性也优异的、由多能干细胞分化诱导为内胚层系细胞的方法和分化诱导试剂盒。根据本发明的分化诱导方法和分化诱导试剂盒，能够有效地形成多能干细胞的聚集体、且能够从分化诱导为内胚层系细胞到细胞功能评价为止一直在粘附的状态下进行培养，因此培养操作的简便性、和细胞功能评价时的操作性变得优异。

附图说明

[0053] 图1是细胞培养基材的示意图(截面图)。

[0054] 图2是本发明的外胚层系细胞的分化诱导方法的示意图。

[0055] 图3是实施例1中的细胞培养基材上的类胚体(拟胚体)的相位差显微镜照片。

[0056] 图4是示出实施例1中的类胚体(拟胚体)的直径和长径比的经时变化的图。

[0057] 图5是示出实施例1和比较例1中的类胚体(拟胚体)外缘部的伪足伸展的状态的相位差显微镜照片。

[0058] 图6是比较例2、3中的类胚体(拟胚体)的相位差显微镜照片。

[0059] 图7是示出本发明的中胚层系细胞的分化诱导方法的示意图。

[0060] 图8示出实施例2中的类胚体(拟胚体)的相位差显微镜照片。

[0061] 图9示出比较例4、5中的相位差显微镜照片。

[0062] 图10示出实施例2和比较例4、5中的与中胚层标记物(BRACHYURY)相关的基因表达量评价结果。

[0063] 图11示出实施例2和比较例4、5中的与未分化标记物(NANOG)相关的基因表达量评价结果。

[0064] 图12是示出实施例3中的培养方法的概要的图。

[0065] 图13是实施例3中的拟胚体的相位差显微镜照片。比例尺表示100μm。

[0066] 图14是比较例6和7中的拟胚体的相位差显微镜照片。比例尺表示100μm。

[0067] 图15是实施例3以及比较例6和7中的未分化标记物(NANOG)和内胚层标记物(SOX17)的基因表达量的评价结果的图。

[0068] 图16是实施例4中经时地拍摄分化诱导的细胞的相位差显微镜照片。比例尺表示200μm。

[0069] 图17是实施例4和实施例5中分化诱导的细胞的相位差显微镜照片和免疫染色后的荧光显微镜照片。比例尺表示200μm。

[0070] 图18是比较例8和实施例4中分化诱导的细胞的相位差显微镜照片。比例尺表示200μm。

[0071] 图19是比较例9中分化诱导的细胞的相位差显微镜照片。比例尺表示200μm。箭头表示从基材上剥离的细胞块。

具体实施方式

[0072] 以下对用于实施本发明的方式(以下简称为“本实施方式”。)进行详细地说明。以下的本实施方式是用于说明本发明的示例,并非旨在将本发明限定为以下的内容。本发明可以在其主旨的范围内进行适宜变形而实施。

[0073] 本说明书中,“多能干细胞”是指具有能分化为各种细胞的特性(未分化性或分化多能性)的细胞。另外,本说明书中“外胚层系细胞”是指:早期胚胎所形成的外胚层中包含的细胞(外胚层细胞)或外胚层来源的组织中包含的细胞(包括神经干细胞、神经细胞)的统称。

[0074] 进而,“神经干细胞”是指进行向神经外胚层的分化诱导,能够分化诱导为胶质细胞(星形细胞、少突细胞)、中枢神经(多巴胺神经、GABA神经)、外周神经(运动神经、感觉神

经)的状态的细胞。另外,本说明书中“中胚层系细胞”是指早期胚胎所形成的中胚层中包含的细胞(中胚层细胞)或中胚层来源的组织中包含的细胞的统称。另外,本说明书中“内胚层系细胞”是指早期胚胎所形成的内胚层中包含的细胞(内胚层细胞)、和内胚层来源的组织中包含的细胞的统称。另外,本说明书中,“未分化性维持”是指培养的细胞具有分化多能性的状态。作为未分化性维持的评价方法,没有特别限定,例如可列举出基于碱性磷酸酶染色的细胞表面标记物的解析、基于免疫染色和流式细胞术的细胞表面/细胞核内标记物的解析、基于实时RT-PCR的基因表达量的解析、多能干细胞所形成的特有结构体即类胚体(拟胚体)形成的确认、通过病理切片来判断在体内的三胚层分化的畸胎瘤检测等。

[0075] 另外,本说明书中,“分化”是指:在多能干细胞的分化诱导路径中位于多能干细胞下游的细胞种类特有的膜蛋白、转录因子等的表达得到确认的状态。进而,“分化诱导”是指:通过在特定的蛋白质、基因、天然物或合成化学物质等的存在下培养细胞,从而使细胞的分化进行。另外,本说明书中,“细胞聚集体(多能干细胞的聚集体)”是指多个细胞(多能干细胞)聚集而形成的三维结构体。进而,“类胚体(拟胚体)”是在胚胎发育早期可见的球状的细胞聚集块(多能干细胞的聚集体),与早期胚胎同样地示出外胚层、中胚层和内胚层的性质。

[0076] 另外,本说明书中,“标记物”是指特定的细胞所特有的蛋白质或基因。分别将多能干细胞所具有的标记物记为“未分化标记物”、将外胚层细胞所具有的标记物记为“外胚层标记物”、将中胚层细胞所具有的标记物记为“中胚层标记物”、将内胚层细胞所具有的标记物记为“内胚层标记物”、将神经干细胞所具有的标记物记为“神经干细胞标记物”、将神经细胞所具有的标记物记为“神经细胞标记物”、将小肠组织细胞所具有的标记物记为“肠上皮细胞标记物”。多能干细胞不具有外胚层标记物、中胚层标记物和内胚层标记物。另外,类胚体(拟胚体)具有外胚层标记物、中胚层标记物和内胚层标记物。

[0077] 另外,本说明书中,“细胞粘附性”是指培养温度下粘附至细胞培养基材的容易度,“具有细胞粘附性”是指在培养温度下细胞能够粘附至细胞培养基材。另外,“不具有细胞粘附性”是指在培养温度下细胞无法粘附至细胞培养基材。

[0078] 另外,本说明书中,“细胞增殖性”是指培养温度下的细胞的增殖容易度,“具有细胞增殖性”是指细胞能够在培养温度下增殖。另外,“不具有细胞增殖性”是指在培养温度下细胞无法增殖。

[0079] <外胚层系细胞的分化诱导方法>

[0080] 本发明的外胚层系细胞的分化诱导方法使用具有以下2个区域的细胞培养基材。(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。(B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性的区域。通过使用具有前述(A)区域的细胞培养基材作为细胞培养基材,从而在后述的(1-1)工序中能够在细胞培养基材上粘附培养多能干细胞,另外,在后述的(1-2)工序中能够形成粘附于细胞培养基材的类胚体(拟胚体)。不具有前述(A)区域的情况下,无法在细胞培养基材上粘附培养多能干细胞,无法形成粘附于细胞培养基材的类胚体(拟胚体)。另外,通过使用具有前述(B)区域的细胞培养基材作为细胞培养基材,从而能够仅在前期(A)区域使多能干细胞增殖,能够形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)。由于形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体),从而能够提高分化诱导效率。不具有前述(B)区域的情况下,无法形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)。

[0081] 作为前述(A)区域的面积，为了适于形成适合分化诱导为外胚层系细胞的尺寸的类胚体(拟胚体)，进一步优选面积0.005～3mm^2，特别优选面积0.01～1.0mm^2，最优选面积0.03～0.8mm^2。

[0082] 作为前述(A)区域的形状，没有特别限定，为了适于提高分化诱导效率，优选圆或椭圆、正多边形，进一步优选圆。

[0083] 作为(B)区域的形状，除了与(A)区域相邻以外没有限定，从适于制造均匀的尺寸和形状的聚集体的观点出发，优选(B)区域与(A)区域的边界线的20％以上的长度相邻，更优选50％以上，进一步优选80％以上，最优选(A)区域的周围全部为(B)区域。另外，从适于提高细胞培养基材的批量生产性的观点出发，优选(A)区域为岛状且(B)区域为海状的海岛结构。

[0084] 作为(A)区域和(B)区域的面积比，没有特别限定，从适于提高细胞培养基材的每单元面积能制造的细胞聚集体的数量的观点出发，(A)区域的面积相对于(A)区域和(B)区域的面积的总计优选为10％以上，更优选30％以上，进一步优选50％以上，最优选70％以上。另外，从适于在多个(A)区域之间设置充分的距离、抑制多个(A)区域的聚集体融合而形成不均匀的形状的观点出发，(B)区域的面积相对于(A)区域和(B)区域的面积的总计优选为20％以上，更优选40％以上，进一步优选60％以上，最优选80％以上。

[0085] 为了适于形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)、提高分化诱导效率，本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材优选：在表面含有由亲水性高分子形成的层，(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理、电晕放电处理中的任一种、或通过它们的组合而使前述由亲水性高分子形成的层的一部分分解或改性的区域。通过使细胞培养基材在表面具有由亲水性高分子形成的层，从而能够抑制(B)区域吸附有助于基材-细胞间粘附的蛋白质、形成不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。

[0086] 另外，由于由亲水性高分子形成的层的一部分被分解或改性，因此能够对(A)区域赋予细胞粘附性或细胞增殖性。另外，为了提高前述(A)区域的细胞粘附性和细胞增殖性，适于在短时间内形成类胚体(拟胚体)，(A)区域进一步优选为等离子体处理区域。

[0087] 对于前述由亲水性高分子形成的层的层厚，为了适于使(B)区域成为不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域，优选10nm以上，进一步优选50nm以上，特别优选100nm以上，最优选500nm以上。另外，为了适于使(A)区域成为具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域，层厚优选1000nm以下，进一步优选500nm以下，特别优选100nm以下，最优选50nm以下。

[0088] 作为前述由亲水性高分子形成的层的形成方法，可以利用形成化学键合的方法、和基于物理相互作用的方法中的至少一种来进行。作为形成化学键合的方法，可列举出紫外线照射、电子束照射、γ射线照射、等离子体处理、电晕处理等形成反应性官能团的方法。另外，也可以利用以离子、自由基为反应源的有机反应进行对基材表面的交联反应。作为基于物理相互作用的方法，可以使用将与成为对象的亲水性高分子的相容性优异的基质作为涂覆材料的涂布、刷涂、浸渍涂布、旋转涂布、棒涂、流涂、喷涂、辊涂、气刀涂布、刮板涂布、凹版涂布、微凹版涂布、狭缝涂布等方法。

[0089] 作为前述亲水性高分子的种类，没有特别限定，可列举出具有羟基、氨基、聚乙二醇基等极性基团的亲水性高分子、具有甜菜碱结构、磷酸胆碱基等两性离子结构的亲水性高分子。为了适于使(B)区域成为不具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域，优选羟基、磷酸

胆碱基、或聚乙二醇基，进一步优选羟基或磷酸胆碱基，特别优选磷酸胆碱基。

[0090] 对于前述亲水性高分子，从适于抑制亲水性高分子从细胞培养基材中溶出、抑制高分子混入细胞聚集体、类胚体(拟胚体)中所导致的对品质的影响的观点出发，优选为具有亲水性的单体单元和疏水性的单体单元这两者的无规共聚物或嵌段共聚物，进一步优选为具有亲水性的单体单元和疏水性的单体单元这两者的无规共聚物。另外，作为前述共聚物的组成比，为了适于使(B)区域成为不具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域，亲水性的单体单元优选为30wt％以上，进一步优选40wt％以上，特别优选50wt％以上，最优选60wt％以上。进而，为了适于抑制亲水性高分子发生溶出，疏水性的单体单元优选为20wt％以上，进一步优选30wt％以上，特别优选40wt％以上，最优选50wt％以上。

[0091] 作为前述亲水性的单体单元，除为亲水性以外没有特别限定，例如可以列举出丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、丙烯酸2-二乙基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-二乙基氨基乙酯、N-[3-(二甲基氨基)丙基]丙烯酰胺等具有氨基者；N-(3-磺丙基)-N-甲基丙烯酰氧基乙基-N,N-二甲基铵甜菜碱、N-甲基丙烯酰氧基乙基-N,N-二甲基铵-α-N-甲基羧基甜菜碱等具有甜菜碱者；丙烯酸羟乙基酯、甲基丙烯酸羟乙基酯、N-(2-羟乙基)丙烯酰胺、聚乙二醇单丙烯酸酯、聚乙二醇单甲基丙烯酸酯、聚丙二醇单丙烯酸酯、聚丙二醇单甲基丙烯酸酯、甲氧基聚乙二醇单丙烯酸酯、甲氧基聚乙二醇单甲基丙烯酸酯、二乙二醇单甲醚丙烯酸酯、二乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯、二乙二醇单乙醚丙烯酸酯、二乙二醇单乙醚甲基丙烯酸酯、丙烯酸2-甲氧基乙基酯、甲基丙烯酸2-甲氧基乙基酯、丙烯酸2-乙氧基乙基酯、甲基丙烯酸2-乙氧基乙基酯、丙烯酸3-丁氧基乙基酯、甲基丙烯酸3-丁氧基乙基酯、3-丁氧基乙基丙烯酰胺、丙烯酸糠基酯、甲基丙烯酸糠基酯、丙烯酸四氢糠基酯、甲基丙烯酸四氢糠基酯等具有聚乙二醇基、甲氧基乙基者；丙烯酸甲氧基甲基酯、甲基丙烯酸甲氧基甲酯、丙烯酸2-乙氧基甲基酯、甲基丙烯酸2-乙氧基甲酯、丙烯酸3-丁氧基甲基酯、甲基丙烯酸3-丁氧基甲酯、3-丁氧基甲基丙烯酰胺等具有丙烯酸酯基者；2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱、2-丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱、3-(甲基)丙烯酰氧基丙基磷酸胆碱、4-(甲基)丙烯酰氧基丁基磷酸胆碱、6-(甲基)丙烯酰氧基己基磷酸胆碱、10-(甲基)丙烯酰氧基癸基磷酸胆碱、ω-(甲基)丙烯酰基(聚)氧乙烯磷酸胆碱、2-丙烯酰胺乙基磷酸胆碱、3-丙烯酰胺丙基磷酸胆碱、4-丙烯酰胺丁基磷酸胆碱、6-丙烯酰胺己基磷酸胆碱、10-丙烯酰胺癸基磷酸胆碱、ω-(甲基)丙烯酰胺(聚)氧乙烯磷酸胆碱等具有磷酸胆碱基者。

[0092] 作为前述疏水性的单体单元，除为疏水性以外没有特别限定，例如可以列举出丙烯酸正丁酯、甲基丙烯酸正丁酯、丙烯酸异丁酯、甲基丙烯酸异丁酯、丙烯酸叔丁酯、甲基丙烯酸叔丁酯、丙烯酸正己酯、甲基丙烯酸正己酯、丙烯酸正辛酯、甲基丙烯酸正辛酯、丙烯酸正癸酯、甲基丙烯酸正癸酯、丙烯酸正十二烷基酯、甲基丙烯酸正十二烷基酯、丙烯酸正十四烷基酯、甲基丙烯酸正十四烷基酯等。

[0093] 对于前述亲水性高分子，另外，从适于抑制亲水性高分子溶出的观点出发，优选包含具有反应性的单体单元。作为具有反应性的单体单元，从通过短时间的处理而能够将亲水性高分子固定化于基材的观点出发，优选具有UV反应性的单体单元，例如可以列举出丙烯酸4-叠氮苯基酯、甲基丙烯酸4-叠氮苯基酯、2-((4-叠氮苯甲酰基)氧基)乙基丙烯酸酯、2-((4-叠氮苯甲酰基)氧基)乙基甲基丙烯酸酯等。

[0094] 前述亲水性高分子还可以包含温度响应性的单体单元，例如可以列举出丙烯酰

胺、甲基丙烯酰胺等(甲基)丙烯酰胺化合物;N,N-二乙基丙烯酰胺、N-乙基丙烯酰胺、N-正丙基丙烯酰胺、N-正丙基甲基丙烯酰胺、N-异丙基丙烯酰胺、N-异丙基甲基丙烯酰胺、N-环丙基丙烯酰胺、N-环丙基甲基丙烯酰胺、N-叔丁基丙烯酰胺、N-乙氧基乙基丙烯酰胺、N-乙氧基乙基甲基丙烯酰胺、N-四氢糠基丙烯酰胺、N-四氢糠基甲基丙烯酰胺等N-烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物;N,N-二甲基(甲基)丙烯酰胺、N,N-乙基甲基丙烯酰胺、N,N-二乙基丙烯酰胺等N,N-二烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物;1-(1-氧代-2-丙烯基)-吡咯烷、1-(1-氧代-2-丙烯基)-哌啶、4-(1-氧代-2-丙烯基)-吗啉、1-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-吡咯烷、1-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-哌啶、4-(1-氧代-2-甲基-2-丙烯基)-吗啉等具有环状基团的(甲基)丙烯酰胺衍生物;甲基乙烯基醚等乙烯基醚;N-脯氨酸甲基酯丙烯酰胺等脯氨酸衍生物。

[0095] 另外,作为本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材的其他制作方法,可以列举出:利用光刻法、喷墨法在细胞培养基材上的一部分区域将促进或抑制细胞粘附性的物质覆盖于基材上的方法;对细胞培养基材的表面施加基于等离子体处理、紫外线处理、电晕放电处理中的任一种、或它们的组合的处理后,覆盖温度响应性高分子的方法等。

[0096] 另外,本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材可以实施灭菌。灭菌的方法没有特别限定,可以使用高压蒸气灭菌、UV灭菌、γ射线灭菌、环氧乙烷气体灭菌等。从适于抑制嵌段共聚物的改性的观点出发,优选高压蒸气灭菌、UV灭菌、环氧乙烷气体灭菌,从适于抑制基材的变形的观点出发,进一步优选UV灭菌或环氧乙烷气体灭菌,从细胞培养基材的批量生产性优异的观点出发,特别优选环氧乙烷气体灭菌。

[0097] 本发明中,细胞培养基材的制作中使用的基材没有特别限定,可以使用通常使用的玻璃、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚偏氟乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙烯甲基丙烯酸酯等高分子化合物、陶瓷、和金属类。从透明性优异、另外成型加工和表面改性容易的观点出发,最优选聚苯乙烯。

[0098] 本发明的分化诱导方法和制造方法的特征在于经过下述(1-1)～(1-4)工序来进行分化诱导。(1-1)进行在细胞培养基材上覆盖选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质、以及接种多能干细胞的工序。(1-2)在未分化性维持培养基的存在下,对在前述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,形成附着于细胞培养基材上的多能干细胞聚集体的工序。(1-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-2)工序中所形成的多能干细胞聚集体,形成类胚体(拟胚体)的工序。(1-4)在含有分化诱导因子的培养基的存在下,以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-3)工序中所形成的类胚体(拟胚体),形成外胚层系细胞聚集体的工序。本发明的分化诱导方法中的(1-1)工序是在前述细胞培养基材上覆盖选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质并接种多能干细胞的工序。通过覆盖选自由前述基质胶、层粘连蛋白、玻连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质,从而能够对(A)区域赋予细胞粘附性和细胞增殖性。未被基质胶、层粘连蛋白、玻连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白和它们的片段中的任意者覆盖的情况下,无法赋予细胞粘附性和细胞增殖性。从适于赋予细胞粘附性和细胞增殖性的观点出发,进一步优选为至少包含层粘连蛋白的4种的组合,特别优选为层粘连蛋白与基质胶、层粘连

蛋白与纤维连接蛋白、或层粘连蛋白与胶原蛋白中的任意组合，最优选为层粘连蛋白单独。

[0099] 前述基质胶、层粘连蛋白、玻连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白和它们的片段可以是天然物，可以是利用基因重组技术等人工合成所得者，也可以是利用限制性酶等切断的片段、以这些生物体来源物质为基础的合成蛋白或者合成肽。

[0100] 本发明中，作为前述基质胶，从获得容易性的方面考虑，作为市售品，例如可以适宜使用Matrigel(Corning Incorporated制)、Geltrex(Gibco制)。

[0101] 前述层粘连蛋白的种类没有特别限定，例如可以使用：据报道对人iPS细胞表面表达的α6β1整合素示出高活性的层粘连蛋白511、层粘连蛋白521或层粘连蛋白511-E8片段。前述层粘连蛋白可以是天然物，可以是利用基因重组技术等人工合成所得者，另外，也可以是以前述层粘连蛋白为基础的合成蛋白或者合成肽。从获得容易性的方面考虑，作为市售品，例如可以适宜使用iMatrix-511(Nippi.Inc.制)。

[0102] 前述玻连蛋白可以是天然物，可以是利用基因重组技术等人工合成所得者，另外，也可以是以前述玻连蛋白为基础的合成蛋白或者合成肽。从获得容易性的方面考虑，作为市售品，例如可以适宜使用玻连蛋白，人血浆来源(和光纯药工业株式会社制)、synthemax(Corning Incorporated制)、玻连蛋白(VTN-N)(Gibco制)。

[0103] 前述纤维连接蛋白可以是天然物，可以是利用基因重组技术等人工合成所得者，另外，也可以是以前述纤维连接蛋白为基础的合成蛋白或者合成肽。从获得容易性的方面考虑，作为市售品，例如可以适宜使用纤维连接蛋白溶液、人血浆来源(和光纯药工业株式会社制)、Retronectin(Takara Bio Inc.制)。

[0104] 前述胶原蛋白的种类没有特别限定，例如可以使用I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白。前述胶原蛋白可以是天然物，可以是利用基因重组技术等人工合成所得者，另外，也可以是以前述胶原蛋白作为基础的合成肽。从获得容易性的方面考虑，作为市售品，例如可以适宜使用胶原蛋白I，人(Corning Incorporated制)、胶原蛋白IV，人(Corning Incorporated制)。

[0105] 作为前述(1-1)工序中的细胞的种类，可以从ES细胞、iPS细胞等具有分化多能性的干细胞中适宜选择，为了适于将本发明的分化诱导方法用于再生医疗、药物研发，优选iPS细胞。前述(1-1)工序中的细胞接种方法没有特别限定，可列举出将细胞呈单分散状态的细胞悬浮液添加至细胞培养基材中、或将细胞聚集体添加至细胞培养基材中的方法，为了在前述(A)区域均匀地形成细胞聚集体，优选使其单分散而接种。使人来源iPS细胞单分散进行培养的情况下，为了抑制由低细胞密度所致的凋亡，优选在接种时添加Rho结合激酶(ROCK)抑制剂。作为ROCK抑制剂，例如可以使用(R)-(+)-反式N-(4-吡啶基)-4-(1-氨基乙基)-环己烷甲酰胺·2HCl·H_2O(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制、商品名：Y-27632)等。作为培养基中添加的ROCK抑制剂的浓度，为对维持人细胞的存活有效的范围且不会对人细胞的未分化状态产生影响的范围，优选为1μM～50μM，更优选为3μM～20μM，进一步优选为5μM～15μM，最优选为8μM～12μM。另外，ROCK抑制剂优选在细胞接种24小时后利用更换为不含有ROCK抑制剂的培养基等方法来去除。

[0106] 细胞的回收方法没有特别限定，例如可以单独利用胰蛋白酶、胶原酶等的酶处理、基于乙二胺四乙酸(EDTA)的螯合处理、刮棒等物理处理、或组合而使用。使用酶处理的情况下，优选无动物来源成分。从获得容易性的观点出发，作为市售品，可以适宜使用TrypLE

Select(Gibco制)、TrypLE Express(Gibco)、Accutase(Nacalai Tesque制)、Accumax(Nacalai Tesque制)。

[0107] 作为前述(1-1)工序中的细胞接种密度,为了适于在短时间内形成均匀的细胞聚集体,优选1.0×10^2个细胞/cm^2以上,进一步优选1.2×10^3个细胞/cm^2以上,特别优选2.0×10^3个细胞/cm^2以上,最优选3.0×10^3个细胞/cm^2以上。另外,为了适于抑制培养基的营养不足所导致的细胞死亡,优选1.0×10^5个细胞/cm^2以下,进一步优选5.0×10^4个细胞/cm^2以下,特别优选2.5×10^4个细胞/cm^2以下,最优选5.0×10^3个细胞/cm^2以下。

[0108] 本发明的分化诱导方法中的(1-2)工序中,在未分化性维持培养基的存在下,对在前述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,形成粘附在细胞培养基材上的多能干细胞聚集体。本发明中"无饲养层"是指:将多能干细胞直接接种在细胞培养基材上进行培养而不使用通过γ射线照射等而失活的细胞(饲养层细胞)的方法。在未分化性维持培养基的存在下,对在前述(1-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,由此能够形成多能干细胞在(A)区域内增殖、沿基材面外方向多层化的细胞聚集体。在不使用未分化性维持培养基的情况下,细胞聚集体丧失分化多能性,分化诱导为外胚层系细胞的效率降低。另外,通过以无饲养层进行培养,从而容易保持培养中的培养基的营养,能够提高细胞存活率、未分化维持。另外,由于为粘附培养,因此与悬浮培养相比,培养基更换作业容易,因此培养作业性优异且能够更换全部培养基,因此能够将从细胞排出的废物的浓度保持在较低状态。另外,由于培养系统中的浓度梯度的影响也低,因此分化诱导效率优异。

[0109] 对于前述未分化性维持培养基而言,作为有助于维持多能干细胞的未分化性的因子,例如可列举出碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子β(TGF-β)、胰岛素样生长因子(IGF)、激活素A、Wnt、胰岛素、转铁蛋白、乙醇胺、2-巯基乙醇、硒酸、油酸、碳酸氢钠,优选含有这些中的至少一种,最优选包含有助于高度维持未分化性的bFGF。培养基的种类没有特别限定,例如可列举出在DMEM、Ham's F12、D-MEM/Ham's F12等基础培养基中添加了有助于维持前述未分化性的因子和非必需氨基酸等培养补充剂的培养基、Primate ES Cell Medium(株式会社REPROCELL制)、StemFit AK02N(味之素株式会社制)、StemFit AK03(味之素株式会社制)、mTeSR1(STEMCELL TECHNOLOGIES制)、TeSR-E8(STEMCELL TECHNOLOGIES制)、ReproNaive(株式会社REPROCELL制)、ReproXF(株式会社REPROCELL制)、ReproFF(株式会社REPROCELL制)、ReproFF2(株式会社REPROCELL制)、NutriStem(Biological Industries Ltd.制)、iSTEM(Takara Bio Inc.制)、GS2-M(Takara Bio Inc.制)、hPSC Growth Medium DXF(PromoCell株式会社制)等市售的未分化维持性培养基。从适于稳定地维持细胞的未分化状态的观点出发,优选Primate ES Cell Medium、StemFit AK02N、StemFit AK03,进一步优选StemFit AK02N、StemFit AK03,最优选StemFit AK02N(味之素株式会社制)。另外,通常细胞培养基中使用的血清中也含有分化诱导因子,因此多能干细胞的未分化维持性培养基优选为无血清培养基。

[0110] 另外,前述(1-2)工序中,为了提高多能干细胞的存活率,也可以添加与前述(1-1)工序同样的ROCK抑制剂。适合的ROCK抑制剂的种类、浓度与前述同样。

[0111] 另外,前述(1-2)工序中,为了适于提高后述的(1-3)～(1-4)工序中的分化诱导效率,优选培养至(A)区域的每单位面积的细胞数为1.0×10^4个细胞/cm^2以上,进一步优选2.0×10^4个细胞/cm^2以上,特别优选5.0×10^4个细胞/cm^2以上,最优选7.5×10^4个细胞/cm^2以

上。另外，为了适于保持培养基的营养、提高(1-3)～(1-4)工序中的细胞的存活率，优选以(A)区域的每单位面积的细胞数为5.0×10^6个细胞/cm^2以下进行(1-3)工序，进一步优选1.0×10^6个细胞/cm^2以下，特别优选5.0×10^5个细胞/cm^2以下，最优选1.0×10^5个细胞/cm^2以下。为了实现前述(A)区域的每单位面积的细胞数，优选在(1-2)工序中进行1～48小时的培养，进一步优选6～36小时，特别优选12～36小时，最优选18～30小时。

[0112] 另外，为了适于提高后述的(1-3)～(1-4)工序中的分化诱导效率，优选在前述(1-2)工序中形成的类胚体(拟胚体)的形状为半球状。本发明的分化诱导方法中的(1-3)工序中，在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-2)工序中所形成的多能干细胞聚集体，形成类胚体(拟胚体)。

[0113] 为了适于提高分化诱导为类胚体(拟胚体)的效率，前述(1-3)工序中的分化诱导因子优选含有外胚层诱导因子、中胚层诱导因子和内胚层诱导因子。作为前述外胚层诱导因子，为了适于提高分化诱导为类胚体(拟胚体)的效率，优选含有Noggin(BMP抑制剂)、Dorsomorphin(BMP抑制剂)、SB431542(TGF-β抑制剂)、激活素抑制剂中的任意者，进一步优选含有BMP抑制剂和TGF-β抑制剂。另外，作为前述中胚层诱导因子，为了适于提高分化诱导为类胚体(拟胚体)的效率，优选含有激活素A、CHIR99021(GSK3β抑制剂)、骨形态发生蛋白(BMP)4中的任意者，进一步优选含有GSK3β抑制剂。进而，作为前述内胚层诱导因子，可列举出激活素A、CHIR99021等低分子化合物。

[0114] 另外，对于前述分化诱导因子在培养基中的添加浓度，没有特别限定，为了适于提高分化诱导为类胚体(拟胚体)的效率，优选为0.1～10μM，更优选为1.0～7.5μM，最优选为2.0～5.0μM。对于包含前述分化诱导因子的培养基，为了充分地进行分化诱导，优选在培养过程中每24小时进行更换。通过在24小时以内更换培养基，从而防止培养基中的分化诱导因子不足，能够使全部细胞均匀地分化。

[0115] 作为在前述(1-3)工序中形成的类胚体(拟胚体)所具有的外胚层标记物，优选PAX6、Nestin、SOX1、SOX2、SOX10、Notch1、E-钙粘蛋白、MAP2，进一步优选PAX6、Nestin、SOX1、SOX2。另外，作为中胚层标记物，优选Tbx1、Brachyury、MSX1、Flk-1，进一步优选Tbx1、Brachyury。另外，作为内胚层标记物，优选FOXA2、SOX17、GATA4、GATA6、CXCR4、HNF3β、HNF4α、αFP，进一步优选FOXA2、SOX17。另外，作为神经干细胞标记物，优选PAX6、Nestin、Olig2、SOX1、SOX2、DCX，进一步优选PAX6、Nestin、SOX1、Olig2。

[0116] 本发明的分化诱导方法中的(1-4)工序中，在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(1-3)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成外胚层系细胞聚集体。通过将在前述(1-3)工序中形成的类胚体(拟胚体)以粘附于细胞培养基材上的状态进行分化诱导，从而前述的诱导因子的浓度梯度所导致的影响小，因此可期待分化均匀地进行。培养基没有特别限定，例如可列举出在DMEM、Ham's F12、D-MEM/Ham's F12等基础培养基中添加发挥诱导外胚层诱导作用的因子和培养补充剂的培养基。

[0117] 作为前述(1-4)工序中由类胚体(拟胚体)分化诱导的细胞的种类，除了为外胚层系细胞以外没有特别限定，例如优选表皮外胚层来源细胞和神经外胚层来源细胞，从适用于再生医疗、药物研发的方面考虑，进一步优选神经外胚层来源细胞。作为神经外胚层来源细胞，没有特别限定，例如优选雪旺前体细胞、髓鞘雪旺细胞、非髓鞘雪旺细胞、放射状胶质细胞、少突细胞前体细胞、少突细胞和星形细胞等神经膠细胞、谷氨酸能神经元、GABA能神

经元、多巴胺能神经细胞、血清素能神经细胞、胆碱能神经细胞、运动神经细胞和感觉神经细胞等神经细胞。外胚层来源细胞为神经细胞的情况下，优选：在含有B27补充剂、TGF-β抑制剂、GSK3β抑制剂、LIF、bFGF、视黄酸、2,6,9-三元取代嘌呤(Purmorphamine)的培养基的存在下培养5～14天后，在含有B27补充剂、TGF-β抑制剂、GSK3β抑制剂、LIF、bFGF、视黄酸、2,6,9-三元取代嘌呤、DAPT的培养基的存在下培养3～5天。进而，在分化为运动神经细胞的情况下，优选在前述的神经细胞培养之后在含有B27补充剂、rhBDNF、rhGDNF、抗坏血酸、视黄酸、DAPT的培养基的存在下培养5～40天。

[0118] ＜中胚层系细胞的分化诱导方法＞

[0119] 以下对用于实施本发明的中胚层系细胞的分化诱导方法的方式进行详细地说明。

[0120] 本发明的分化诱导方法使用具有下述(A)、(B)这2个区域的细胞培养基材。(A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。(B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。

[0121] 通过使用具有前述(A)区域的细胞培养基材作为细胞培养基材，从而能够在后述的(2-2)工序中在细胞培养基材上粘附培养多能干细胞，另外，能够形成粘附于细胞培养基材的类胚体(拟胚体)。不具有前述(A)区域的情况下，无法在细胞培养基材上粘附培养多能干细胞，无法形成粘附于细胞培养基材的类胚体(拟胚体)。另外，通过使用具有前述(B)区域的细胞培养基材作为细胞培养基材，从而能够使多能干细胞仅在前期(A)区域增殖，能够形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)。由于形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)，因此能够提高分化诱导效率。不具有前述(B)区域的情况下，无法形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)。

[0122] 作为前述(A)区域的面积，为了适于形成适合分化诱导为中胚层系细胞的尺寸的类胚体(拟胚体)，进一步优选面积0.005～3mm^2，特别优选面积0.01～1.0mm^2，最优选面积0.03～0.8mm^2。

[0123] 对于前述(A)区域的形状，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0124] 对于(B)区域的形状，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0125] 对于(A)区域和(B)区域的面积比，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0126] 对于本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材，为了适于形成尺寸均匀的类胚体(拟胚体)、提高分化诱导效率，优选在表面具有包含亲水性高分子的层，并且(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理和/或电晕放电处理而使前述包含亲水性高分子的层分解或改性的区域。通过使细胞培养基材在表面具有包含亲水性高分子的层，能够抑制(B)区域吸附有助于基材-细胞间粘附的蛋白质，形成不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。另外，通过使包含亲水性高分子的层的一部分被分解或改性，从而能够对(A)区域赋予细胞粘附性或细胞增殖性。另外，为了适于提高前述(A)区域的细胞粘附性和细胞增殖性、在短时间内形成类胚体(拟胚体)，(A)区域进一步优选为等离子体处理区域。

[0127] 另外，对于本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材，为了适于提高细胞增殖性，优选：(A)区域为不具有亲水性高分子的区域、(B)区域为具有包含亲水性高分子的层的区域，(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理和/或电晕放电处理而改性的基材表面露出的区域，进一步优选：(A)区域为不具有亲水性高分子的区域、(B)区域为具有包含亲水性高分子的层的区域。

[0128] 对于前述包含亲水性高分子的层的层厚，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同

样。

[0129] 对于前述包含亲水性高分子的层的形成方法，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0130] 对于前述亲水性高分子的种类，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0131] 对于前述亲水性高分子，从适于抑制亲水性高分子从细胞培养基材溶出、抑制高分子混入细胞聚集体、类胚体(拟胚体)中所导致的对品质的影响的观点出发，优选为具有亲水性的单体单元和疏水性的单体单元这两者的无规共聚物或嵌段共聚物，进一步优选为具有亲水性的单体单元和疏水性的单体单元这两者的无规共聚物。另外，对于前述共聚物的组成比，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0132] 对于前述亲水性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0133] 对于前述疏水性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0134] 对于前述亲水性高分子，从适于抑制亲水性高分子溶出的观点出发，优选还包含具有反应性的单体单元。对于具有反应性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0135] 对于前述亲水性高分子，可以包含温度响应性的单体单元，对于温度响应性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0136] 另外，对于本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材的其他制作方法，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0137] 另外，本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材也可以实施灭菌。对于灭菌的方法，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0138] 本发明中，对于细胞培养基材的制作中使用的基材，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0139] 本发明的分化诱导方法的特征在于经过下述(2-1)～(2-3)工序而进行分化诱导。(2-1)进行在细胞培养基材上覆盖选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质，以及接种多能干细胞的工序。(2-2)在未分化性维持培养基的存在下，对在前述(2-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附在细胞培养基材上的类胚体(拟胚体)的工序。(2-3)在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成中胚层系细胞聚集体的工序。

[0140] 本发明的分化诱导方法中的(2-1)工序是如下工序：在前述细胞培养基材上覆盖选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质，并且接种多能干细胞的工序。

[0141] 通过覆盖前述选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质，从而能够对(A)区域赋予细胞粘附性和细胞增殖性。未被基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段中的任意者覆盖的情况下，无法赋予细胞粘附性和细胞增殖性。从适于赋予细胞粘附性和细胞增殖性的观点出发，进一步优选为至少包含层粘连蛋白的4种的组合，特别优选为层粘连蛋白与基质胶、层粘连蛋白与纤维连接蛋白、或层粘连蛋白与胶原蛋白中的任意组合，最优选为层粘连蛋白单独。

[0142] 对于前述基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0143] 作为前述(2-1)工序中的细胞的种类，可以从ES细胞、iPS细胞等具有分化多能性的干细胞中适宜选择，但为了适于将本发明的分化诱导方法用于再生医疗、药物研发，优选iPS细胞。前述(2-1)工序中的细胞接种方法没有特别限定，可列举出将细胞呈单分散状态的细胞悬浮液添加至细胞培养基材中、或将细胞聚集体添加至细胞培养基材中的方法，为了在前述(A)区域均匀地形成细胞聚集体，优选使其单分散而接种。使人来源iPS细胞单分散进行培养的情况下，为了抑制低细胞密度所导致的凋亡，优选在接种时添加Rho结合激酶(ROCK)抑制剂。对于ROCK抑制剂，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0144] 作为前述(2-1)工序中的细胞接种密度，为了适于在短时间内形成均匀的细胞聚集体，优选1.0×10^2个细胞/cm^2以上，进一步优选1.2×10^3个细胞/cm^2以上，特别优选2.0×10^3个细胞/cm^2以上，最优选3.0×10^3个细胞/cm^2以上。另外，为了适于抑制培养基的营养不足所导致的细胞死亡，优选1.0×10^6个细胞/cm^2以下，进一步优选5.0×10^5个细胞/cm^2以下，特别优选2.5×10^4个细胞/cm^2以下，最优选5.0×10^3个细胞/cm^2以下。

[0145] 本发明的分化诱导方法中的(2-2)工序中，在未分化性维持培养基的存在下，对在前述(2-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，形成粘附在细胞培养基材上的类胚体(拟胚体)。本发明中“无饲养层”是指：将多能干细胞直接接种在细胞培养基材上进行培养而不使用通过γ射线照射等而失活的细胞(饲养层细胞)的方法。在未分化性维持培养基的存在下，对在前述(2-1)工序中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，从而能够形成多能干细胞在(A)区域内增殖、沿基材面外方向多层化的类胚体(拟胚体)。不使用未分化性维持培养基的情况下，类胚体(拟胚体)丧失分化多能性，分化诱导为中胚层系细胞的效率降低。另外，通过以无饲养层进行培养，从而容易保持培养中的培养基的营养，能够提高细胞存活率、未分化维持。另外，由于为粘附培养，因此与悬浮培养相比，培养基更换作业容易，因此培养作业性优异且能够更换全部培养基，因此能够将从细胞排出的废物的浓度保持在较低状态。另外，培养系统中的浓度梯度的影响也低，因此分化诱导效率优异。

[0146] 对于前述未分化性维持培养基，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0147] 另外，前述(2-2)工序中，为了提高多能干细胞的存活率，也可以添加与前述(2-1)工序同样的ROCK抑制剂。适合的ROCK抑制剂的种类、浓度与前述同样。

[0148] 另外，前述(2-2)工序中，为了适于提高后述的(2-3)工序中的分化诱导效率，优选培养至(A)区域的每单位面积的细胞数为1.0×10^4个细胞/cm^2以上，进一步优选2.0×10^4个细胞/cm^2以上，特别优选5.0×10^4个细胞/cm^2以上，最优选7.5×10^4个细胞/cm^2以上。另外，为了适于保持培养基的营养、提高(2-3)工序中的细胞的存活率，优选以(A)区域的每单位面积的细胞数为5.0×10^6个细胞/cm^2以下进行(2-3)工序，进一步优选1.0×10^6个细胞/cm^2以下，特别优选5.0×10^5个细胞/cm^2以下，最优选1.0×10^5个细胞/cm^2以下。

[0149] 为了形成前述(A)区域的每单位面积的细胞数，优选在(2-2)工序中进行1～48小时的培养，进一步优选6～36小时，特别优选12～36小时，最优选18～30小时。

[0150] 另外，为了适于提高后述的(2-3)工序中的分化诱导效率，可以适宜设定前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)的形状，例如可以列举出圆、椭圆、多边形、由不定形的直线或曲线形成的闭合的形状等。另外，从适于制造接近球形的球状体的观点出发，作为岛

状的形状，优选圆或椭圆、多边形，进一步优选圆或椭圆、长方形，特别优选圆或椭圆、正方形，最优选圆或椭圆。

[0151] 另外，本发明中，从适于制造接近球形的球状体的观点出发，作为岛状的形状的长径比，优选5以下，进一步优选2以下，特别优选1.5以下，最优选1.1以下。此处，本发明中“长径比”是指作为形状的最大直径(长径)与最小直径(短径)之比的长径/短径。

[0152] 本发明的分化诱导方法中的(2-3)工序中，在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成中胚层系细胞。

[0153] 为了适于提高分化诱导为中胚层系细胞的效率，优选前述(2-3)工序中的分化诱导因子含有中胚层诱导因子。作为前述中胚层诱导因子，为了适于提高分化诱导为类胚体(拟胚体)的效率，优选为选自由GSK3β抑制剂、骨形态发生蛋白(BMP)和激活素组成的组中的单独一种或多种分化诱导因子，特别优选含有激活素A、CHIR99021(GSK3β抑制剂)、BMP4中的任意者。

[0154] 另外，对于前述分化诱导因子在培养基中的添加浓度，没有特别限定，为了适于提高分化诱导为类胚体(拟胚体)的效率，优选为1000～500ng/mL，更优选为500～100ng/mL，最优选为100ng/mL以下。

[0155] 对于包含前述分化诱导因子的培养基，为了充分地进行分化诱导，优选在培养过程中每24小时进行更换。通过在24小时以内更换培养基，从而能够防止培养基中的分化诱导因子不足，能够使全部细胞均匀地分化。

[0156] 作为前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)所具有的中胚层标记物，优选FLK-1、MESP1、MESP2、FOXF1、HAND1、EVX1、IRX3、CDX2、TBX6、MIXL1、SNAI1、FOXC1、PDGFRα，最优选BRACHYURY。

[0157] 本发明的分化诱导方法中的(2-3)工序中，在含有分化诱导因子的培养基的存在下，以粘附于细胞培养基材上的状态培养前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)，形成中胚层系细胞聚集体。通过将前述(2-2)工序中所形成的类胚体(拟胚体)以粘附于细胞培养基材上的状态进行分化诱导，从而前述的诱导因子的浓度梯度所导致的影响小，可期待能够均匀地进行分化。(2-3)工序中使用的培养基没有特别限定，例如可列举出在DMEM、Ham's F12、D-MEM/Ham's F12等基础培养基中添加了中胚层分化诱导因子和培养补充剂的培养基。

[0158] 作为在前述(2-3)工序中由类胚体(拟胚体)分化诱导的细胞的种类，除了为中胚层系细胞以外没有特别限定，例如优选血液细胞、平滑肌细胞、生殖细胞，从适用于再生医疗、药物研发的方面考虑，进一步优选骨细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞和肾细胞。

[0159] ＜内胚层系细胞的分化诱导方法＞

[0160] 以下对用于实施本发明的内胚层系细胞的分化诱导方法的方式进行详细地说明。

[0161] 本发明的分化诱导方法中，使用具有下述(A)区域和(B)区域的细胞培养基材。

[0162] (A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域。

[0163] (B)与(A)区域相邻、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。

[0164] 通过使用具有(A)区域的细胞培养基材作为细胞培养基材，从而能够在后述的工序(3-2)中在胞培养基材上粘附培养多能干细胞，另外，能够形成粘附于细胞培养基材的拟

胚体。细胞培养基材不具有(A)区域的情况下，无法在细胞培养基材上粘附培养多能干细胞，无法形成粘附于细胞培养基材的拟胚体。另外，通过使用具有(B)区域的细胞培养基材作为细胞培养基材，从而能够使多能干细胞仅在(A)区域增殖，能够形成尺寸均匀的拟胚体。通过形成尺寸均匀的拟胚体，从而能够提高分化诱导效率。细胞培养基材不具有(B)区域的情况下，无法形成尺寸均匀的拟胚体。

[0165] 作为(A)区域的面积，为了适于形成适合分化诱导为内胚层系细胞的尺寸的拟胚体，更优选0.005～3mm^2，进一步优选0.02～2.5mm^2，最优选0.03～2.0mm^2。

[0166] 对于(A)区域的形状，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0167] 对于本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材，为了适于形成尺寸均匀的拟胚体、提高分化诱导效率，优选在表面具有包含亲水性高分子的层，并且(A)区域为通过选自由等离子体处理、紫外线处理和电晕放电处理组成的组中的至少1种处理而使包含亲水性高分子的层分解或改性的区域。通过使细胞培养基材在表面具有包含亲水性高分子的层，从而能够抑制(B)区域吸附有助于基材-细胞间粘附的蛋白质，使(B)区域成为不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域。另外，通过使包含亲水性高分子的层的一部分被分解或改性，从而能够对(A)区域赋予细胞粘附性和细胞增殖性。另外，为了适于提高(A)区域的细胞粘附性和细胞增殖性、在短时间内形成拟胚体，进一步优选(A)区域为通过等离子体处理而被分解或改性的区域。

[0168] 另外，对于本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材，为了适于提高细胞增殖性，优选：(A)区域为不具有亲水性高分子的区域、(B)区域为具有包含亲水性高分子的层的区域，更优选：(A)区域是通过等离子体处理、紫外线处理和/或电晕放电处理而改性的基材表面露出的区域，(B)区域是具有包含亲水性高分子的层的区域。

[0169] 对于前述包含亲水性高分子的层的层厚，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0170] 作为前述包含亲水性高分子的层的形成方法，可以列举出与关于外胚层系细胞的分化诱导方法所示例的形成方法相同的方法。

[0171] 作为前述亲水性高分子的种类，可以列举出与关于外胚层系细胞的分化诱导方法所示例者相同的亲水性高分子。

[0172] 对于前述亲水性高分子，从适于抑制亲水性高分子从细胞培养基材溶出、抑制高分子混入细胞聚集体、拟胚体中所导致的对品质的影响的观点出发，优选为具有亲水性的单体单元和疏水性的单体单元这两者的无规共聚物或嵌段共聚物，更优选为具有亲水性的单体单元和疏水性的单体单元这两者的无规共聚物。另外，对于前述共聚物的组成比，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0173] 对于前述亲水性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0174] 对于前述疏水性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0175] 对于前述亲水性高分子，从适于抑制亲水性高分子溶出的观点出发，优选还包含具有反应性的单体单元。对于具有反应性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0176] 对于前述亲水性高分子，还可以包含温度响应性的单体单元。对于温度响应性的单体单元，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0177] 另外,对于本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材的其他制作方法,与<外胚层系细胞的分化诱导方法>同样。

[0178] (B)区域与(A)区域相邻、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性。由于(B)区域是与(A)区域相邻且不具有细胞增殖性的区域,因此在培养细胞时,能够形成仅在(A)区域形成细胞的聚集体、在(A)区域的周围不存在细胞的状态。另外,从适于使所制造的聚集体的尺寸和形状均匀化的观点出发,(B)区域优选不仅不具有细胞增殖性而且不具有细胞粘附性。

[0179] 对于(B)区域的形状,与<外胚层系细胞的分化诱导方法>同样。

[0180] 对于(A)区域和(B)区域的面积比,与<外胚层系细胞的分化诱导方法>同样。

[0181] 另外,本发明的分化诱导方法中使用的细胞培养基材也可以实施灭菌。对于灭菌的方法,与<外胚层系细胞的分化诱导方法>同样。

[0182] 本发明中,对于细胞培养基材的制作中使用的基材,与<外胚层系细胞的分化诱导方法>同样。

[0183] 本发明的分化诱导方法包括下述工序(3-1)、工序(3-2)和工序(3-3)。

[0184] 工序(3-1):实施如下操作的工序,在具有前述的(A)区域和(B)区域的细胞培养基材中,以细胞培养基材的培养面的面积作为基准,以层粘连蛋白及其片段的总量成为1～100μg/cm^2的方式添加包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物,以及接种多能干细胞。

[0185] 工序(3-2):在未分化性维持培养基的存在下,对在工序(3-1)中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养,形成粘附于细胞培养基材的培养面上的拟胚体的工序。

[0186] 工序(3-3):在含有分化诱导因子的培养基的存在下,在粘附于细胞培养基材的培养面上的状态下培养工序(3-2)中所形成的拟胚体,进行分化诱导而形成内胚层系细胞的聚集体的工序。

[0187] 工序(3-1)是实施如下操作的工序,在前述的细胞培养基材中,以前述细胞培养基材的培养面的面积作为基准,以层粘连蛋白及其片段的总量成为1～100μg/cm^2的方式添加包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物,以及接种多能干细胞。需要说明的是,细胞培养基材的培养面是指:在培养时与培养基接触的面中的细胞能够附着的面(细胞因重力沉淀,因此通常为与垂直方向成直角的面)。通过添加包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物,从而可用选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种覆盖细胞培养基材的培养面。由此,(A)区域所具有的细胞粘附性和细胞增殖性在分化诱导时的培养过程中也可得以维持。不用选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种覆盖的情况下,无法维持细胞粘附性和细胞增殖性。从适于维持分化诱导时的培养中的细胞粘附性的观点出发,包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物更优选为仅包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物。对于包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物的添加量,以细胞培养基材的培养面的面积作为基准,层粘连蛋白及其片段的总量更优选为1.2～50μg/cm^2的量,最优选为1.5～10μg/cm^2的量。前述添加量低于1μg/cm^2的情况下,在分化诱导时的培养过程中,无法维持细胞粘附性。

[0188] 在用选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种覆盖细胞培养基材的培养面时,可以利用在细胞培养基材中添加用PBS等稀释选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种而得到的溶液(组合物)并静置数小时的预涂法,也可以利用将包含选自层粘连蛋白及其片段中的至

少1种的组合物以与接种多能干细胞时的细胞悬浮液混合的状态添加至细胞培养基材中的添加法。即，工序(3-1)中，包含选自层粘连蛋白及其片段中的至少1种的组合物的添加可以在接种多能干细胞之前实施，也可以同时实施。

[0189] 对于层粘连蛋白及其片段，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0190] 作为工序(3-1)中接种的多能干细胞的种类，可以从ES细胞、iPS细胞等具有分化多能性的干细胞中适宜选择，但为了适用于再生医疗、药物研发，优选iPS细胞。工序(3-1)中的多能干细胞接种方法没有特别限定，可列举出将多能干细胞呈单分散状态的细胞悬浮液添加至细胞培养基材中、或将细胞聚集体添加至细胞培养基材中的方法。这些方法中，为了在(A)区域均匀地形成细胞聚集体，优选使其单分散而接种。使人来源iPS细胞单分散进行培养的情况下，为了抑制低细胞密度所导致的凋亡，优选在接种时添加Rho结合激酶(ROCK)抑制剂。对于ROCK抑制剂，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0191] 作为工序(3-1)中的细胞接种密度，为了适于在短时间内形成均匀的细胞聚集体，优选1.0×10^2个细胞/cm^2以上，更优选1.2×10^3个细胞/cm^2以上，进一步优选2.0×10^3个细胞/cm^2以上，最优选3.0×10^3个细胞/cm^2以上。另外，为了适于抑制培养基的营养不足所导致的细胞死亡，优选1.0×10^6个细胞/cm^2以下，更优选5.0×10^5个细胞/cm^2以下，进一步优选1.0×10^5个细胞/cm^2以下，最优选2.5×10^4个细胞/cm^2以下。

[0192] 工序(3-2)是在未分化性维持培养基的存在下，对在工序(3-1)中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养而形成粘附于细胞培养基材的培养面上的拟胚体的工序。本说明书中“无饲养层”是指：将多能干细胞直接接种在细胞培养基材上进行培养而不使用通过γ射线照射等而失活的细胞(饲养层细胞)的方法。通过在未分化性维持培养基的存在下，对在工序(3-1)中接种的多能干细胞进行无饲养层粘附培养，从而能够形成多能干细胞在(A)区域内增殖、沿基材面外方向多层化的拟胚体。在不使用未分化性维持培养基的情况下，拟胚体丧失分化多能性，分化诱导为内胚层系细胞的效率降低。另外，通过以无饲养层方式进行培养，从而容易保持培养中的培养基的营养，能够提高细胞存活率，容易维持未分化性。另外，由于为粘附培养，从而与悬浮培养相比培养基更换作业容易，因此培养作业性优异且能够更换全部培养基，因此能够将细胞所排出的废物的浓度保持为较低状态。另外，培养系统中的浓度梯度的影响也低，因此分化诱导效率优异。

[0193] 对于前述未分化性维持培养基，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0194] 工序(3-2)中，为了提高多能干细胞的存活率，也可以添加与工序(3-1)同样的ROCK抑制剂。适合的ROCK抑制剂的种类、浓度与前述同样。

[0195] 工序(3-2)中，为了适于提高后述的工序(3-3)中的分化诱导效率，优选培养至(A)区域的每单位面积的细胞数为1.0×10^4个细胞/cm^2以上，更优选2.0×10^4个细胞/cm^2以上，进一步优选5.0×10^4个细胞/cm^2以上，最优选7.5×10^4个细胞/cm^2以上。另外，为了适于保持培养基的营养、提高工序(3-3)中的细胞的存活率，优选以(A)区域的每单位面积的细胞数为5.0×10^6个细胞/cm^2以下进行工序(3-3)，更优选1.0×10^6个细胞/cm^2以下，进一步优选5.0×10^5个细胞/cm^2以下，最优选1.0×10^5个细胞/cm^2以下。

[0196] 为了使(A)区域的每单位面积的细胞数在前述范围内，工序(3-2)中优选进行1～48小时的培养，更优选6～36小时，进一步优选12～36小时，最优选18～30小时。

[0197] 工序(3-2)中所形成的拟胚体的形状可以适宜设定，例如可以列举出球、椭圆体、

多面体、以及由不定形的平面和/或曲面形成的闭合形状等。为了适于提高后述的工序(3-3)中的分化诱导效率，工序(3-2)中所形成的拟胚体的形状优选为球状或半球状。拟胚体的形状可以通过细胞培养基材的(A)区域的形状(岛状的形状)进行控制。

[0198] 从适于制造接近球的形状(例如，球状、半球状)的拟胚体的观点出发，作为岛状的形状，优选圆或椭圆、多边形，进一步优选圆或椭圆、长方形，特别优选圆、椭圆或正方形，最优选圆或椭圆。

[0199] 另外，从适于制造接近球的形状(例如，球状、半球状)的拟胚体的观点出发，作为岛状的形状的长径比，优选5以下，进一步优选2以下，特别优选1.5以下，最优选1.1以下。此处，本说明书中“长径比”是指：作为形状的最大直径(长径)与最小直径(短径)之比的长径/短径。

[0200] 工序(3-3)是如下工序：在含有分化诱导因子的培养基的存在下，在粘附于细胞培养基材的培养面上的状态下培养工序(3-2)中所形成的拟胚体，进行分化诱导而形成内胚层系细胞的聚集体的工序。

[0201] 作为分化诱导因子，例如可列举出TGF-β抑制剂、ATP竞争性抑制剂和GSK3抑制剂。分化诱导因子可以单独使用1种，也可以组合使用2种以上。

[0202] 为了适于提高分化诱导为内胚层系细胞的效率，工序(3-3)中的分化诱导因子优选含有内胚层分化诱导因子。作为前述内胚层分化诱导因子，为了适于提高分化诱导效率，优选为选自由Wnt蛋白、骨形态发生蛋白(BMP)、胰岛素样生长因子和激活素组成的组中的至少1种分化诱导因子，尤其更优选含有Wnt3a、BMP4、IGFI和激活素A中的任意者。

[0203] 另外，对于前述分化诱导因子在培养基中的添加浓度，没有特别限定，为了适于提高分化诱导效率，优选为1000～500ng/mL，更优选为500～100ng/mL，最优选为100ng/mL以下。

[0204] 对于包含前述分化诱导因子的培养基，为了充分地进行分化诱导，优选在培养过程中每24小时进行更换。通过在24小时以内更换培养基，从而防止培养基中的分化诱导因子不足，能够使全部细胞均匀地分化。

[0205] 作为工序(3-3)中所形成的内胚层系细胞所具有的内胚层标记物，优选FOXA2、CXCR4、NKX2.1、AFP、SERPINA1、SST、ISL1、IPF1、IAPP、PAX4、TAT，最优选SOX17。

[0206] 工序(3-3)中，在粘附于细胞培养基材的培养面上的状态下培养拟胚体。通过在粘附于细胞培养基材的培养面上的状态下对工序(3-2)中所形成的拟胚体进行分化诱导，从而前述的分化诱导因子的浓度梯度所导致的影响小，因此可期待分化均匀地进行。工序(3-3)中使用的培养基没有特别限定，例如可列举出在DMEM、Ham’s F12、D-MEM/Ham’s F12等基础培养基中添加内胚层分化诱导因子和培养补充剂的培养基。

[0207] 作为在工序(3-3)中由拟胚体分化诱导的细胞的种类，除了内胚层系细胞以外没有特别限定，例如优选甲状腺细胞、尿路系统细胞，从为适用于再生医疗、药物研发的方面考虑，更优选胃上皮细胞、肝脏细胞、胰腺细胞和肠上皮细胞。

[0208] 前述肠上皮细胞优选具有选自由肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞和肠上皮干细胞组成的组中的至少1种细胞，更优选包含肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞和肠上皮干细胞全部。肠上皮细胞具有特有的标记物。例如，作为肠细胞标记物，可列举出CDX2，作为吸收上皮细胞标记物，可列举出VIL1，作为胚细胞标记物，可列举出MUC2，作

为肠内分泌细胞标记物，可列举出CGA，作为潘氏细胞标记物，可列举出DEFA6，作为肠上皮干细胞标记物，可列举出LGR5。

[0209] 工序(3-3)中得到的内胚层系细胞的聚集体的形状通常与工序(3-2)中所形成的拟胚体的形状相同。作为聚集体的形状，具体而言，例如可列举出接近球的形状(例如，球状、半球状)。

[0210] ＜三胚层系细胞的分化诱导试剂盒＞

[0211] 具备具有下述(A)区域和下述(B)区域的细胞培养基材的、分化诱导为三胚层系细胞的试剂盒可以还具备选自由基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段组成的组中的单独一种或多种物质(基质)，可以还具备含有分化诱导因子的培养基(分化诱导培养基)，也可以还具备基质和分化诱导培养基。

[0212] (A)具有细胞粘附性和细胞增殖性的面积0.001～5mm^{2}的岛状的区域

[0213] (B)与前述(A)区域邻接、且不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域

[0214] 在将前述试剂盒用于分化诱导之前，在具有下述(A)区域和下述(B)区域的细胞培养基材中，以细胞培养基材的培养面的面积作为基准，以基质的总量为1～100μg/cm^{2}的方式添加包含前述的基质的组合物。

[0215] 对于基质胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和它们的片段，与＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞同样。

[0216] “三胚层系细胞”是外胚层系细胞、中胚层系细胞和内胚层系细胞的统称。通过选择性地使用与分化诱导试剂盒一起使用的分化诱导因子或分化诱导试剂盒所具备的分化诱导因子，从而能够分化诱导外胚层系细胞、中胚层系细胞和内胚层系细胞中的任意者。

[0217] 以外胚层系细胞的分化诱导为目的的情况下，可以以＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞中示例的培养基中的添加浓度使用＜外胚层系细胞的分化诱导方法＞中示例的外胚层诱导因子。以中胚层系细胞的分化诱导为目的的情况下，可以以＜中胚层系细胞的分化诱导方法＞中示例培养基中的添加浓度使用＜中胚层系细胞的分化诱导方法＞中示例的中胚层诱导因子。以内胚层系细胞的分化诱导为目的的情况下，可以以＜内胚层系细胞的分化诱导方法＞中示例培养基中的添加浓度使用＜内胚层系细胞的分化诱导方法＞中示例的内胚层分化诱导因子。

[0218] 实施例

[0219] 以下列举用于实施本发明的方式对本发明的外胚层系细胞的分化诱导方法进行详细地说明，但是其为用于说明本发明的示例，并非旨在将本发明限定为以下内容。另外，可以在本发明的主旨范围内适宜变更而实施。需要说明的是，只要没有特别声明，则试剂使用市售品。

[0220] ＜类胚体(拟胚体)的直径和长径比＞

[0221] 使用倒置相位差显微镜(OLYMPUS CORPORATION制、型号:IX73)和数码相机(OLYMPUS CORPORATION制、型号:DP73)经时地观察类胚体(拟胚体)，测定长轴/短轴长度。根据求出的长轴和短轴长度，计算出长径比(长轴/短轴)并用于类胚体(拟胚体)形态的评价。需要说明的是，本发明中的实施例中形成了圆状的图案，长径比在理论上为1.0。

[0222] [实施例1]

[0223] ＜分化诱导培养基等的组成＞

[0224] 分化诱导培养基1:80％DMEM/F-12(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、20％KnockOut Serum Replacement XenoFree(Thermo Fisher Scientific制)、0.1mM非必需氨基酸(Sigma-Aldrich制)、0.1mM 2-巯基乙醇(Sigma-Aldrich制)、4ng/mL碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、3μMSB431542(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)、3μMDorsomorphin(Sigma-Aldrich制)、3μM CHIR99021(REPROCELL公司制)

[0225] 分化诱导培养基2:98％ KBM神经干细胞培养用无血清培养基(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、2％ B27添加剂(Invitrogen公司制)、20ng/mL bFGF、10ng/mL重组人来源LIF(hLIF、Merck公司制)、2μMSB431542、3μM CHIR99021、2μM视黄酸(Sigma-Aldrich制)、1μM 2,6,9-三元取代嘌呤(Merck公司制)

[0226] 分化诱导培养基3:98％ KBM神经干细胞培养用无血清培养基、2％ B27添加剂、2ng/mL bFGF、10ng/mL hLIF、2μM SB431542、3μM CHIR99021、2μM视黄酸、1μM 2,6,9-三元取代嘌呤、5μM DAPT(自“分化第16天”添加,Sigma-Aldrich制)

[0227] 细胞剥离液:TrypLE select(Gibco制)和0.5mM EDTA溶液(Invitrogen公司制)的1:1混合物

[0228] 膜渗透处理液:0.3％TritonX-100(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、含有1％牛血清白蛋白的PBS(-)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)溶液

[0229] 封闭液、抗体稀释液和流式细胞术解析用缓冲液:含1％BSA的PBS(-)溶液

[0230] [实施例1]

[0231] ＜多能干细胞聚集体的制作＞

[0232] 用具有多个直径0.2mm的圆形的孔的金属掩模(MITANI MICRONICSCo.,Ltd.制)覆盖表面覆盖了直径35mm的亲水性高分子的培养皿(Sumitomo Bakelite Co.,Ltd.制、商品名:PrimeSurface(注册商标)),使用等离子体照射装置(株式会社真空デバイス制、商品名:プラズマイオンボンバーダPIB-20)从金属掩模上部进行等离子体处理(20Pa气压下、导电电流20mA、照射时间30秒),由此制作了具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域的细胞培养基材。

[0233] 在前述经图案化的细胞培养基材中以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基的StemFitAK02N(味之素株式会社制),进而以3900个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以2.5μL/mL的浓度加入iMatrix-511溶液(Nippi.Inc.制)。在37℃、CO_2浓度5％的环境下进行培养。另外,在自细胞接种起24小时后,在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。通过相位差显微镜观察,确认了粘附在细胞培养基材上的多个半球状的细胞聚集体。

[0234] ＜类胚体(拟胚体)的制作＞

[0235] 在自细胞接种起24小时后,以2.0mL/培养皿加入分化诱导培养基1,开始进行分化诱导。图3是实施例1中的细胞培养基材上的类胚体(拟胚体)的相位差显微镜照片。需要说明的是,将添加了分化诱导培养基1的时间点作为“分化第0天”。然后,直至“分化第5天”为止每培养24小时更换分化诱导培养基1。另外,在培养基更换时使用相位差显微镜按照前述步骤测量类胚体(拟胚体)的长轴/短轴,确认了均匀地形成了金属掩模的孔尺寸的直径

0.2mm的类胚体(拟胚体)。图4是示出实施例1中的类胚体(拟胚体)的直径和长径比的经时变化的图。图4的纵轴(左)表示类胚体的直径(μm),纵轴(右)表示长径比(形状的最大直径(长径)与最小直径(短径)之比即长径/短径),横轴表示从分化第0天到分化第5天为止的天数。需要说明的是,图4中央部是指培养皿内的包括细胞粘附面的中心在内的部分,外缘部是指培养皿内的、包括细胞粘附面与培养皿侧面的边界在内的部分。如由图4可知,直至分化第5天为止长径比维持在1.0,类胚体(拟胚体)的形状也均匀,因此启示出构成类胚体(拟胚体)的细胞的分化进程是同步的。

[0236] ＜外胚层系细胞聚集体的制作＞

[0237] 分化诱导至“分化第5天”后,从培养皿中去除分化诱导培养基1,以2.0mL/培养皿加入分化诱导培养基2。然后,直至“分化第12天”为止每培养48小时更换分化诱导培养基2。在“分化第10天”,观察类胚体(拟胚体)从基材表面游离的状态。在“分化第12天”,去除培养皿内的分化诱导培养基2,以2.0mL/培养皿加入分化诱导培养基3。然后,直至“分化第19天”为止每培养48小时更换分化诱导培养基3。

[0238] ＜类胚体(拟胚体)的细胞数测量＞

[0239] 在“分化第5天”中,去除培养皿内的分化诱导培养基1,以2.0mL/培养皿加入PBS(-),进行清洗。清洗后,在培养皿中以1.0mL/培养皿加入细胞剥离液,在37℃、CO_2浓度5%的环境下静置3分钟。静置规定时间后,去除细胞剥离液,以1.0mL/培养皿加入包含Y-27632(浓度10μM)的分化诱导培养基1,使用细胞刮棒(IWAKI制)使类胚体(拟胚体)从基材上剥离和分散。回收得到的细胞悬浮液,使用Luna自动细胞计数装置(Logos Biosystems制)测量了细胞数。

[0240] ＜外胚层系细胞聚集体的细胞数测量＞

[0241] 在“分化第19天”,去除培养皿内的分化诱导培养基3,以2.0mL/培养皿加入PBS(-),进行清洗。清洗后,在培养皿中以1.0mL/培养皿加入细胞剥离液,在37℃、CO_2浓度5%的环境下静置3分钟。静置规定时间后,去除细胞剥离液,以1.0mL/培养皿加入包含Y-27632(浓度10μM)的分化诱导培养基1,使用细胞刮棒(IWAKI制)使类胚体(拟胚体)从基材上剥离和分散。回收得到的细胞悬浮液,使用Luna自动细胞计数装置(Logos Biosystems制)测量了细胞数。

[0242] ＜流式细胞术解析＞

[0243] 为了评价向三类胚体(拟胚体)、神经干细胞和神经细胞的分化诱导,对外胚层标记物(PAX6)、内胚层标记物(FOXA2)、中胚层标记物(TBX1)、神经干细胞标记物(SOX1)、神经细胞标记物(NCAM1和TUBB3)进行了评价。将在细胞数测量中回收的“分化第5天”和“分化第19天”的细胞分别以1.0×10^5个/管加入到1.5mL样品管中。以0.5mL/管加入4%多聚甲醛(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制),分散后在室温下静置20分钟来进行固定化处理。固定化处理后,进行离心分离(室温、800×g、5分钟),去除上清液并以0.5mL/管加入PBS(-)进行清洗。重复3次清洗操作。清洗后,以0.5mL/管加入膜渗透处理液,分散后在室温下静置15分钟来进行膜渗透处理。膜渗透处理后,进行离心分离,去除上清液并以0.5mL/管加入PBS(-)进行清洗。

[0244] 清洗后,以0.5mL/管加入含1%BSA的PBS(-),分散后在室温下静置1小时来进行封闭处理。封闭处理后,进行离心分离,去除上清液并以0.5mL/管加入PBS(-)进行清洗。清洗

后，以0.1mL/管加入稀释的抗体溶液，在分散后在室温和遮光下反应1小时。反应后，进行离心分离，去除染色液，以0.5mL/管加入PBS(-)进行清洗。在前述抗体反应中使用未进行荧光标记的抗体的情况下，接着以0.1mL/管加入稀释的荧光标记二抗，在分散后在室温和遮光下反应1小时。反应后，进行离心分离，去除染色液，以0.5mL/管加入PBS(-)进行清洗。清洗后，以0.5mL/管加入抗体稀释液，通过流式细胞仪(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社制、商品名:BD Accuri C6 Plus)对分散的样品进行解析。

[0245] 将“分化诱导第5天”的细胞的流式细胞术解析结果示于表1，将“分化诱导第19天”的细胞的流式细胞术解析结果示于表2。在“分化诱导第5天”，20.0%的细胞具有作为外胚层标记物的PAX6，另外，26.3%的细胞具有作为中胚层标记物的TBX1、28.3%的细胞具有作为内胚层标记物的FOXA2，20.8%的细胞具有作为内胚层标记物的SOX1，确认了类胚体(拟胚体)样结构体的制作。另外，在“分化诱导第19天”，确认了11.4%的细胞具有作为神经细胞标记物的NCAM1和46.9%的细胞具有作为神经细胞标记物的TUBB3，确认了分化诱导为神经细胞的效率优异。

[0246] [表1]

[0247] 表1

[0248]

	PAX6(+)	TBX1(+)	FOXA2(+)	SOX1(+)
比较例3	3.8%	1.8%	0.9%	0.4%
实施例1	20.0%	26.3%	28.3%	20.8%
比较例2	17.4%	31.3%	39.4%	15.4%

[0249] [表2]

[0250] 表2

[0251]

	PAX6(+)	SOX1(+)	NCAM1(+)	TUBB3(+)
比较例3	3.8%	0.4%	2.4%	1.7%
实施例1	1.0%	1.3%	11.4%	46.9%
比较例2	0.4%	1.1%	10.6%	26.1%

[0252] [比较例1:细胞培养基材上的未分化性维持培养]

[0253] 代替实施例1中作为培养基的分化诱导培养基1～3，使用未分化性维持培养基StemFitAK02N(味之素株式会社制)，此外全部在与实施例1相同条件下进行培养，培养6天(直至实施例1中的“分化诱导第5天”为止)。在培养第2天(实施例中的“分化诱导第1天”)中，未观察到实施例1中确认的类胚体(拟胚体)外缘部的伪足伸展，确认了对未分化性维持起作用。

[0254] [比较例2:细胞培养用聚苯乙烯基材上的分化诱导]

[0255] <多能干细胞聚集体的制作、和类胚体(拟胚体)的制作>

[0256] 使用市售的培养基材(Tissue culture处理聚苯乙烯、eppemdorf公司制)，依据实施例1中记载的方法制作了类胚体(拟胚体)。所形成的结构体的形态整体上呈锐角形状，大小也是不均匀的(图6)。

[0257] <外胚层系细胞聚集体的制作>

[0258] 依据实施例1中记载的方法将前述类胚体(拟胚体)分化诱导为外胚层系细胞聚集体。在“分化第7～10天”，确认达到了100%汇合，在“分化第16天”，在培养基更换时观察到

类胚体(拟胚体)剥离为片状的现象(图6)。

[0259] <流式细胞术解析>

[0260] 依据实施例1中记载的方法,实施了流式细胞术解析。将“分化诱导第5天”的细胞的流式细胞术解析结果示于表1,将“分化诱导第19天”中的细胞的流式细胞术解析结果示于表2。在“分化诱导第19天”,具有作为神经细胞标记物的NCAM1的细胞为10.6%、具有TUBB3的细胞为26.1%,确认了分化诱导为神经细胞的效率差。

[0261] [比较例3:细胞培养用聚苯乙烯基材上的未分化性维持培养]

[0262] 实施例1中的分化诱导操作全部未进行,利用与实施例1同样的方法直接对实施例1的接种中使用的人iPS细胞进行了流式细胞术解析。

[0263] 以下列举用于实施本发明的方式对本发明的中胚层系细胞的分化诱导方法进行详细地说明,但其为用于说明本发明的示例,并非旨在将本发明限定为以下内容的主旨。另外,可以在本发明的主旨范围内适宜变更而实施。需要说明的是,只要没有特别声明,则试剂使用市售品。

[0264] <类胚体(拟胚体)的拍摄>

[0265] 使用倒置相位差显微镜(OLYMPUS CORPORATION制、型号:IX73)和数码相机(OLYMPUS CORPORATION制、型号:DP73)观察类胚体(拟胚体)。

[0266] <分化诱导培养基等的组成>

[0267] 分化诱导培养基1:STEMdiff Trilineage Mesoderm Medium(Stemcell Technologies制)

[0268] 细胞剥离液:TrypLE select(ThermoFisher制)和0.5mM EDTA溶液(Invitrogen公司制)的1:1混合物

[0269] [实施例2]

[0270] <多能干细胞聚集体的制作>

[0271] 用具有多个直径0.2mm的圆形的孔的金属掩模(MITANI MICRONICS Co.,Ltd.制)覆盖表面覆盖了直径35mm的亲水性高分子的培养皿(Sumitomo Bakelite Co.,Ltd.制、商品名:PrimeSurface(注册商标)),使用等离子体照射装置(株式会社真空デバイス制、商品名プラズマイオンボンバーダPIB-20)从金属掩模上部进行等离子体处理(20Pa气压下、导电电流20mA、照射时间30秒),由此制作了具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域(A)的细胞培养基材。

[0272] 在前述细胞培养基材中以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基的StemFitAK02N(味之素株式会社制),进而以3900个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以2.5μL/mL的浓度加入iMatrix-511溶液(Nippi.Inc.制)。在37℃、CO_2浓度5%的环境下进行培养。另外,在自细胞接种起24小时后,在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。通过相位差显微镜观察,确认了粘附在细胞培养基材上的多个圆形的类胚体(拟胚体)(图8)。

[0273] <中胚层系细胞聚集体的制作>

[0274] 在自细胞接种起24小时后,以2.0mL/培养皿加入分化诱导培养基1,开始进行分化诱导。需要说明的是,将添加了分化诱导培养基1的时间点作为“分化第0天”。然后,直至“分化第6天”为止每培养24小时更换分化诱导培养基1。

[0275] ＜中胚层系细胞聚集体的细胞数测量＞

[0276] 在“分化第6天”，去除培养皿内的分化诱导培养基1，以2.0mL/培养皿加入PBS(-)，进行清洗。清洗后，在培养皿中以1.0mL/培养皿加入细胞剥离液，在37℃、CO_2浓度5％的环境下静置5分钟。静置规定时间后，去除细胞剥离液，以1.0mL/培养皿加入分化诱导培养基1，使用细胞刮棒(IWAKI制)使类胚体(拟胚体)从基材上剥离和分散。回收得到的细胞悬浮液，使用Luna自动细胞计数装置(Logos Biosystems制)测量了细胞数。

[0277] ＜基因表达解析＞

[0278] 为了评价向中胚层系细胞的分化诱导，对中胚层标记物(BRACHYURY)、未分化标记物(NANOG)进行了评价。将在细胞数测量中回收的“分化第6天”的细胞分别以1.0×10^6个/管加入到1.5mL样品管中。进行离心分离(室温、800×g、5分钟)，去除上清液。使用RNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN公司制)，从细胞中提取RNA。用Qubit4 Fluorometer测定提取的RNA的浓度，用RNase-free Water(Takara Bio Inc.制)调整浓度至1μg/6μL。逆转录反应使用ReverTra Ace qRT Master Mix with gDNA Remover(东洋纺株式会社制)。对于1μL的5倍稀释cDNA(相当于逆转录产物的1/100)，使用具有下述表3的基因序列(BRACHYURY:序列号4、NANOG:序列号2、GAPDH:序列号3)的低聚dT引物(INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES公司制)和THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(东洋纺株式会社制)，通过QuantStudio3实时PCR系统(Thermo Fisher Scientific株式会社制)进行实时PCR解析。

[0279] 将“分化诱导第6天”的细胞的基因表达解析结果示于图10、11。图10的纵轴表示BRACHYURY相对于GAPDH的相对基因表达量，图11的纵轴表示NANOG相对于GAPDH的相对基因表达量。在任意图中，横轴均为实施例2、比较例4或比较例5。由图10、11，在“分化诱导第6天”，确认了类胚体(拟胚体)样结构体的制作，细胞失去作为未分化标记物的NANOG，具有作为中胚层标记物的BRACHYURY。另外，通过对细胞进行图案化，从而BRACHYURY的表达量增大，由此确认了图案化中的粘附培养使分化显著进行。

[0280] [表3]

[0281]

引物	序列(5'→3')
BRACHYURY	CGTCTCCTTCAGCAAAGTCAA CTATGTGGATTCGAGGCTCATAC
NANOG	AACTCTCCAACATCCTGAACC CCTTCTGCGTCACACCATT
GAPDH	ACATCGCTCAGACACCATG TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG

[0282] [比较例4:细胞培养用聚苯乙烯基材上的分化诱导]

[0283] ＜多能干细胞聚集体的单层培养＞

[0284] 在市售的培养基材(Tissue culture处理聚苯乙烯、eppendorf公司制)中以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基的StemFitAK02N(味之素株式会社制)，以5000个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以2.5μL/mL的浓度加入iMatrix-511溶液(Nippi.Inc.制)。在37℃、CO_2浓度5％的环境下进行培养。另外，在自细胞接种起24小时后，在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。

[0285] ＜中胚层系分化诱导＞

[0286] 针对进行了前述单层培养的细胞，使用分化培养基1，进行6天中胚层系细胞的分化诱导。图9(左图)是分化诱导第6天的状态。如由图9可知，细胞粘附于整个基材上，未形成球形状的拟胚体。

[0287] ＜基因表达解析＞

[0288] 依据实施例2中记载的方法，实施了基因表达解析。

[0289] [比较例5:细胞培养用聚苯乙烯基材上的未分化维持培养]

[0290] ＜多能干细胞聚集体的制作、和类胚体(拟胚体)的制作＞

[0291] 使用与实施例2同等的基材，依据实施例2中记载的方法，制作了类胚体(拟胚体)。

[0292] ＜未分化维持培养＞

[0293] 针对前述类胚体(拟胚体)，使用StemFitAK02N进行6天未分化维持培养。图9(右图)为未分化维持培养第6天的状态。

[0294] ＜基因表达解析＞

[0295] 依据实施例2中记载的方法，实施了基因表达解析。

[0296] 以下基于实施例对本发明的内胚层系细胞的分化诱导方法进行更具体地说明。但是，本发明不受以下的实施例限定。需要说明的是，只要没有特别声明，则试剂使用市售品。

[0297] ＜(A)区域的面积的测定＞

[0298] 使用激光显微镜(KEYENCE CORPORATION制、制品名VK-X200)，获得了细胞培养基材的表面的图像。使用得到的图像，在解析软件(VK-XViewer)上求出20处的(A)区域的面积，对它们的面积进行平均而作为(A)区域的面积。

[0299] ＜细胞、和细胞的聚集体的拍摄＞

[0300] 使用倒置相位差显微镜(OLYMPUS CORPORATION制、型号:IX73)、数码相机(OLYMPUS CORPORATION制、型号:DP73)，拍摄了细胞、和细胞的聚集体的相位差显微镜图像和荧光显微镜图像。

[0301] ＜分化诱导培养基等的组成＞

[0302] 分化诱导培养基1:STEMdiff Trilineage Mesoderm Medium(Stemcell Technologies制)

[0303] 分化诱导培养基2:85％ KnockOut DMEM(ThermoFisher制)、15％KnockOut Serum Replacement XenoFree(ThermoFisher制)、0.1mM非必需氨基酸(Sigma-Aldrich制)、2mM Gluta Max-I Supplement(ThermoFisher制)、20ng/mL碱性成纤维细胞生长因子(bFGF、PEPRO TECH制)、50μg/mL L(+)-抗坏血酸(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、10ng/mL调节蛋白-β-1(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、200ng/mL Long(R) R3IGF-I(Sigma-Aldrich制)、1％青霉素-链霉素溶液(×100)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

[0304] 细胞剥离液:TrypLE select(ThermoFisher制)和0.5mM EDTA溶液(Invitrogen公司制)的1:1混合物

[0305] [实施例3]

[0306] 图12是示出培养方法的概要的图。图1是细胞培养基材的示意图(截面图)。以下根据需要边参照图1和图12边进行说明。

[0307] ＜多能干细胞的聚集体的制作＞

[0308] 用具有多个直径0.2mm的圆形的孔的金属掩模(MITANI MICRONICS Co.,Ltd.制)覆盖用亲水性高分子覆盖了表面的直径35mm的培养皿(Sumitomo Bakelite Co.,Ltd.制、商品名:PrimeSurface(注册商标)),使用等离子体照射装置(株式会社真空デバイス制、商品名プラズマイオンボンバーダPIB-20)从金属掩模上部进行等离子体处理(20Pa气压下、导电电流20mA、照射时间30秒),由此在经等离子体处理的部分形成了具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域((A)区域)。另外,在用金属掩模覆盖的部分(未经等离子体处理的部分)形成了(B)区域。得到的细胞培养基材的概略如图1的示意图所示。即,图1所示的细胞培养基材30中,基材21的表面被亲水性高分子20覆盖,进而在经等离子体处理的部分,亲水性高分子20被分解而形成了A所示的(A)区域。另外,在未经等离子体处理的部分,亲水性高分子20原样残留而形成了B所示的(B)区域。将其用作细胞培养基材。

[0309] 在前述细胞培养基材中,以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基(图12中,如符号10所示。)的StemFitAK02N(味之素株式会社制),进而以3900个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以细胞培养基材的培养面的面积为基准以1.5μg/cm^2加入iMatrix-511溶液(层粘连蛋白片段溶液、Nippi.Inc.制)(图12所示的工序(3-1))。如图12的工序(3-1)所示,接种的人iPS细胞201B7株(图12中,如符号1所示。)粘附于A所示的(A)区域、而不粘附于B所示的(B)区域。接着,在37℃、CO_2浓度5%的环境下进行培养。另外,从细胞接种起24小时后,在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。通过相位差显微镜观察,确认了粘附在细胞培养基材上的多个圆形的拟胚体(图12中,如符号3所示。)(图12所示的工序(3-2))。

[0310] ＜内胚层系细胞的聚集体的制作＞

[0311] 自细胞接种起24小时后,以2.0mL/培养皿加入分化诱导培养基1(图12中,如符号11所示。),开始进行分化诱导。需要说明的是,将添加了分化诱导培养基1的时间点作为“分化第0天”。然后,直至“分化第6天”为止每培养24小时更换分化诱导培养基1(图12所示的工序(3-3))。在“分化第6天”得到了内胚层系细胞的聚集体(图12中,如符号7所示。)(图13)。

[0312] ＜内胚层系细胞的聚集体的细胞数测量＞

[0313] 在“分化第6天”,去除培养皿内的分化诱导培养基1,以2.0mL/培养皿加入PBS(-),进行清洗。清洗后,在培养皿中以1.0mL/培养皿加入细胞剥离液,在37℃、CO_2浓度5%的环境下静置5分钟。静置后,去除细胞剥离液,以1.0mL/培养皿加入分化诱导培养基1,使用细胞刮棒(IWAKI制)使内胚层系细胞的聚集体从细胞培养基材上剥离,使细胞分散。回收得到的细胞悬浮液,使用Luna自动细胞计数装置(Logos Biosystems制)测量了细胞数。

[0314] ＜基因表达解析＞

[0315] 为了评价向内胚层系细胞的分化诱导,采用管家基因标记物(GAPDH)、未分化标记物(NANOG)、内胚层标记物(SOX17),对未分化标记物和内胚层标记物的mRNA的相对表达水平进行定量。将在细胞数测量中回收的“分化第6天”的细胞分别以1.0×10^6个/管加入到1.5mL样品管中。进行离心分离(室温、800×g、5分钟),去除上清液。使用RNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN公司制),从细胞中提取RNA。用Qubit4 Fluorometer测定提取的RNA的浓度,用RNase-free Water(Takara Bio Inc.制)调整浓度至1μg/6μL。逆转录反应使用ReverTra Ace qRT Master Mix with gDNA Remover(东洋纺株式会社制)。针对1μL的5倍稀释cDNA(相当于逆转录产物的1/100),使用低聚dT引物、具有下述表4所示的碱基序列的引物

(INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES公司制)和THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(东洋纺株式会社制)通过QuantStudio3实时PCR系统(Thermo Fisher Scientific株式会社制)进行实时PCR解析。

[0316] 图15是未分化标记物(NANOG)和内胚层标记物(SOX17)的基因表达量的评价结果的图。图15的纵轴表示NANOG或SOX17相对于GAPDH的相对基因表达量,横轴为实施例3、比较例6或比较例7。实施例3中,确认了拟胚体的形成,另外,根据图15,“分化诱导第6天”的细胞中的基因表达量的评价结果是确认了作为内胚层标记物的SOX17的表达。

[0317] [表4]

[0318]

引物	序列号	序列(5′→3′)
SOX17	序列号1	AACGCCGAGTTGAGCAAGGCCGGTACTTGTAGTTGG
NANOG	序列号2	AACTCTCCAACATCCTGAACCCCTTCTGCGTCACACCATT
GAPDH	序列号3	ACATCGCTCAGACACCATGTGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG

[0319] [比较例6:细胞培养用聚苯乙烯基材上的分化诱导]

[0320] <多能干细胞的聚集体的单层培养>

[0321] 在市售的细胞培养基材(Tissue culture处理聚苯乙烯、eppendorf公司制)中以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基的StemFitAK02N(味之素株式会社制),以3900个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以细胞培养基材的培养面的面积为基准以1.5μg/cm^2的浓度加入iMatrix-511溶液(层粘连蛋白片段溶液、Nippi.Inc.制)。在37℃、CO_2浓度5%的环境下进行培养。另外,自细胞接种起24小时后,在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。

[0322] <向内胚层系细胞的分化诱导>

[0323] 针对如此进行了单层培养的细胞,添加分化诱导培养基1,进行6天内胚层系细胞的分化诱导。图14(左图)示出分化诱导第6天的状态。如由图14(左图)可知,细胞发生了聚集(aggregation)。

[0324] ＜基因表达解析＞

[0325] 依据实施例3中记载的方法实施了基因表达解析。将结果示于图15。比较例6中,基因表达量的评价结果是未确认到内胚层标记物的表达,仅确认了未分化标记物的表达。

[0326] [比较例7:细胞培养用聚苯乙烯基材上的未分化维持培养]

[0327] ＜多能干细胞的聚集体的制作＞

[0328] 使用与实施例3同等的基材,依据实施例3中记载的方法制作了拟胚体。

[0329] ＜未分化维持培养＞

[0330] 针对得到的拟胚体,添加StemFitAK02N进行6天未分化维持培养。图14(右图)示出分化诱导第6天的状态。

[0331] ＜基因表达解析＞

[0332] 依据实施例3中记载的方法实施了基因表达解析。将结果示于图15。比较例7中,基因表达量的评价结果是未确认到内胚层标记物的表达,仅确认到了未分化标记物的表达。

[0333] [实施例4]

[0334] ＜多能干细胞的聚集体的制作＞

[0335] 用具有多个直径0.8mm的圆形的孔的金属掩模(MITANI MICRONICSCo.,Ltd.制)覆

盖用亲水性高分子覆盖了表面的直径35mm的培养皿(Sumitomo Bakelite Co.,Ltd.制、商品名:PrimeSurface(注册商标)),在与实施例3同样的条件下进行等离子体处理,形成了具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域((A)区域)和(B)区域。将其用作细胞培养基材。

[0336] 在得到的细胞培养基材中,以2.0mL/培养皿加入StemFitAK02N(味之素株式会社制),进而以24000个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以细胞培养基材的培养面的面积为基准以1.5μg/cm^2加入iMatrix-511溶液(层粘连蛋白片段溶液、Nippi.Inc.制),在37℃、CO_2浓度5%的环境下进行培养。另外,自细胞接种起24小时后,在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。通过相位差显微镜观察,确认了粘附在细胞培养基材上的多个圆形的拟胚体。

[0337] ＜多能干细胞向肠上皮细胞的分化诱导＞

[0338] 在自细胞接种起24小时后,以2.0mL/培养皿加入分化诱导培养基2,开始进行分化诱导。需要说明的是,将添加了分化诱导培养基2的时间点作为“分化第0天”。然后,直至“分化第64天”为止每培养72小时更换分化诱导培养基2。图16为经时地拍摄分化诱导的细胞的相位差显微镜照片。需要说明的是,比例尺表示200μm。如图16所示,确认了从分化第0天起至第64天为止能够在粘附于细胞培养基材上的状态下进行细胞培养。

[0339] ＜免疫染色解析＞

[0340] 为了评价向肠上皮细胞的分化,采用吸收上皮细胞标记物(VILLIN),作为荧光标记抗体使用Villin Polyclonal Antibody,Alexa Fluor 488Conjugated(1μg/μL,Bioss制)。针对分化第64天的培养细胞以1.0mL/培养皿加入4%多聚甲醛(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制),在室温下静置20分钟来进行固定化处理。固定化处理后,去除全部溶液,以1.0mL/培养皿加入PBS(-)进行清洗。重复3次清洗操作。清洗后,以0.5mL/培养皿加入膜渗透处理液,分散后在室温下静置15分钟来进行膜渗透处理。膜渗透处理后,去除溶液,以1.0mL/培养皿加入PBS(-)进行清洗。清洗后,以1.0mL/培养皿加入含1%BSA的PBS(-),在室温下静置1小时来进行封闭处理。封闭处理后,去除溶液,以1.0mL/培养皿加入PBS(-)进行清洗。清洗后,以1.0mL/培养皿加入用含1%BSA的PBS(-)进行200倍稀释的抗体溶液,在分散后在室温和遮光下反应2小时(抗体量:5.0μg)。反应后,去除染色液,以1.0mL/培养皿加入PBS(-)进行清洗。清洗后,用荧光显微镜拍摄加入了抗体稀释液1.0mL/培养皿的样品。将获得的荧光图像示于图17。图17是分化诱导的细胞(分化第64天)的相位差显微镜照片和免疫染色后的荧光显微镜照片。图17还示出后述的实施例5中分化诱导的细胞的相位差显微镜照片和免疫染色后的荧光显微镜照片。需要说明的是,比例尺表示200μm。实施了64天分化诱导的细胞显示出吸收上皮细胞标记物VILLIN阳性。即,确认了:在将细胞粘附于细胞培养基材的状态下,多能干细胞能分化诱导为肠上皮细胞。

[0341] [实施例5]

[0342] 代替具有多个直径0.8mm的圆形的孔的金属掩模,使用具有多个直径1.5mm的圆形的孔的金属掩模,除此以外与实施例4同样地制作了细胞培养基材。另外,使用得到的细胞培养基材,与实施例4同样地进行多能干细胞的聚集体的制作、和多能干细胞向肠上皮细胞的分化诱导。

[0343] 针对分化诱导第64天的细胞,与实施例4同样地实施了免疫染色解析。其结果,与实施例4同样,分化诱导第64天的细胞保持与基材的粘附状态并且显示出吸收上皮细胞标

记物VILLIN阳性(图17)。由该结果确认了:即使将(A)区域的直径扩大至1.5mm,也能够在将细胞粘附至细胞培养基材的状态下使多能干细胞分化诱导为肠上皮细胞。

[0344] [比较例8:层粘连蛋白511-E8片段覆盖条件研究]

[0345] 在与实施例5相同的细胞培养基材中以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基的StemFitAK02N(味之素株式会社制),进而以24000个/cm^2加入人iPS细胞201B7株、以细胞培养基材的培养面的面积为基准以0.9μg/cm^2加入iMatrix-511溶液(层粘连蛋白片段溶液、Nippi.Inc.制)。在37℃、CO_2浓度5%的环境下进行培养。另外,自细胞接种起24小时后,在培养基中添加了Y-27632(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)(浓度10μM)。将细胞接种日作为“培养第0天”,将24小时后作为“培养第1天”,用相位差显微镜拍摄细胞的状态。

[0346] 图18是比较例8和实施例4中分化诱导的细胞的相位差显微镜照片。需要说明的是,比例尺表示200μm。以细胞培养基材的培养面的面积作为基准以0.9μg/cm^2的条件覆盖层粘连蛋白片段(层粘连蛋白511-E8)的比较例8的细胞培养基材中,在刚接种后观察到多能干细胞的粘附,但在24小时后确认了细胞从细胞粘附区域上剥离。确认了在比较例8的覆盖条件下难以实现在将细胞粘附维持在细胞培养基材上的状态下进行培养。

[0347] [比较例9:使用了玻连蛋白的覆盖条件研究]

[0348] 在与实施例5相同的细胞培养基材中,以1.0mL/培养皿加入1%玻连蛋白(VTN-N)重组人蛋白溶液(Gibco制),在25℃下静置1小时。1小时后去除1%VTN-N溶液,以2.0mL/培养皿加入作为未分化性维持培养基的StemFitAK02N(味之素株式会社制),进而以成为24000个/cm^2的方式加入人iPS细胞201B7株,与实施例4同样地实施了分化诱导培养。将分化诱导第55天的细胞的状态(相位差显微镜照片)示于图19。在分化诱导第55天,确认了细胞从细胞培养基材上剥离。确认了在比较例9的培养条件下无法将分化诱导中的细胞粘附维持在细胞培养基材上。

[0349] 附图标记说明

[0350] A…(A)区域(具有细胞粘附性和细胞增殖性的区域)、B…(B)区域(不具有细胞粘附性或细胞增殖性的区域)、1…多能干细胞、2…多能干细胞聚集体、3…拟胚体、4…外胚层系细胞聚集体、5…神经细胞聚集体、6:中胚层系细胞聚集体、7…内胚层系细胞的聚集体、10…未分化性维持培养基、11…分化诱导培养基1、12…分化诱导培养基2、13…分化诱导培养基3、20…亲水性高分子、21…基材、30…细胞培养基材。

序列表

<110> 东曹株式会社(TOSOH CORPORATION)

<120> 分化诱导为多能干细胞的外胚层、中胚层和内胚层系细胞的方法

<130> 200-0090WO

<150> P2020-138106

<151> 2020-08-18

<150> P2021-075272

<151> 2021-04-27

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

aacgccgagt tgagcaaggc cggtacttgt agttgg 36

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

aactctccaa catcctgaac cccttctgcg tcacaccatt 40

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

acatcgctca gacaccatgt gtagttgagg tcaatgaagg g 41

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

cgtctccttc agcaaagtca actatgtgga ttcgaggctc atac 44

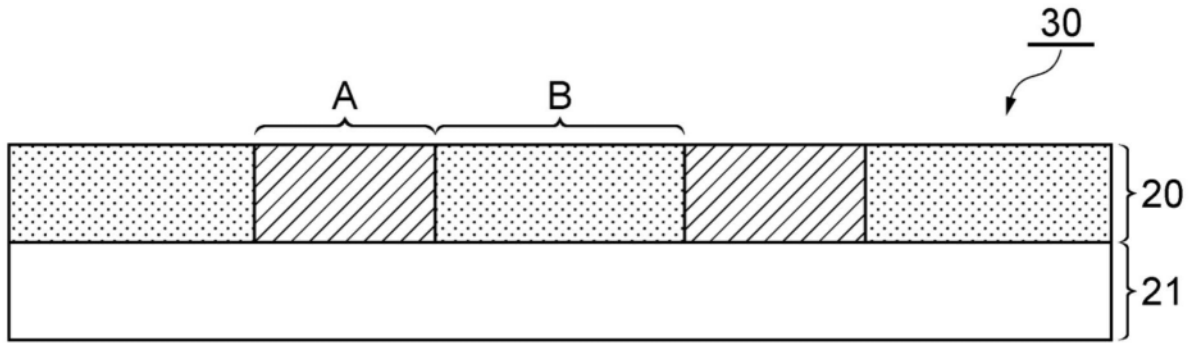


图1

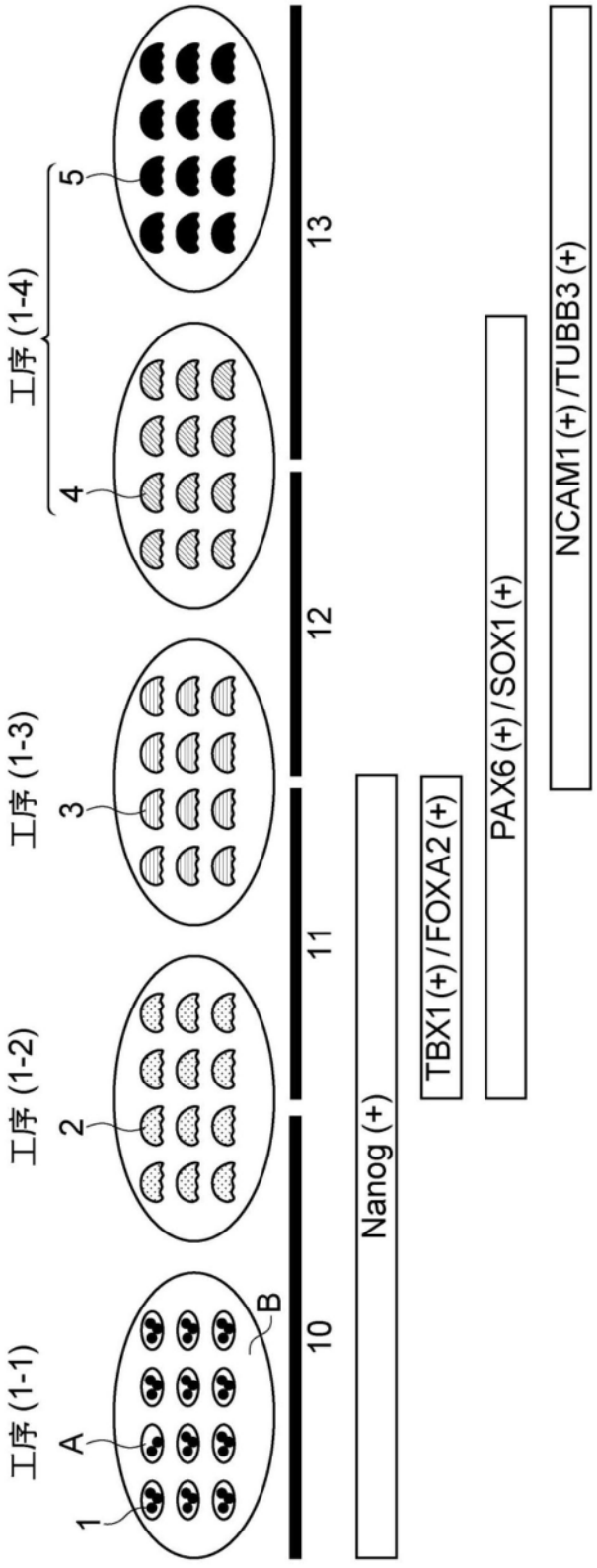

工序 (1-1)
工序 (1-2)
工序 (1-3)
工序 (1-4)
1
2
3
4
5
A
B
10
11
12
13
Nanog (+)
TBX1 (+) / FOXA2 (+)
PAX6 (+) / SOX1 (+)
NCAM1 (+) / TUBB3 (+)

图2

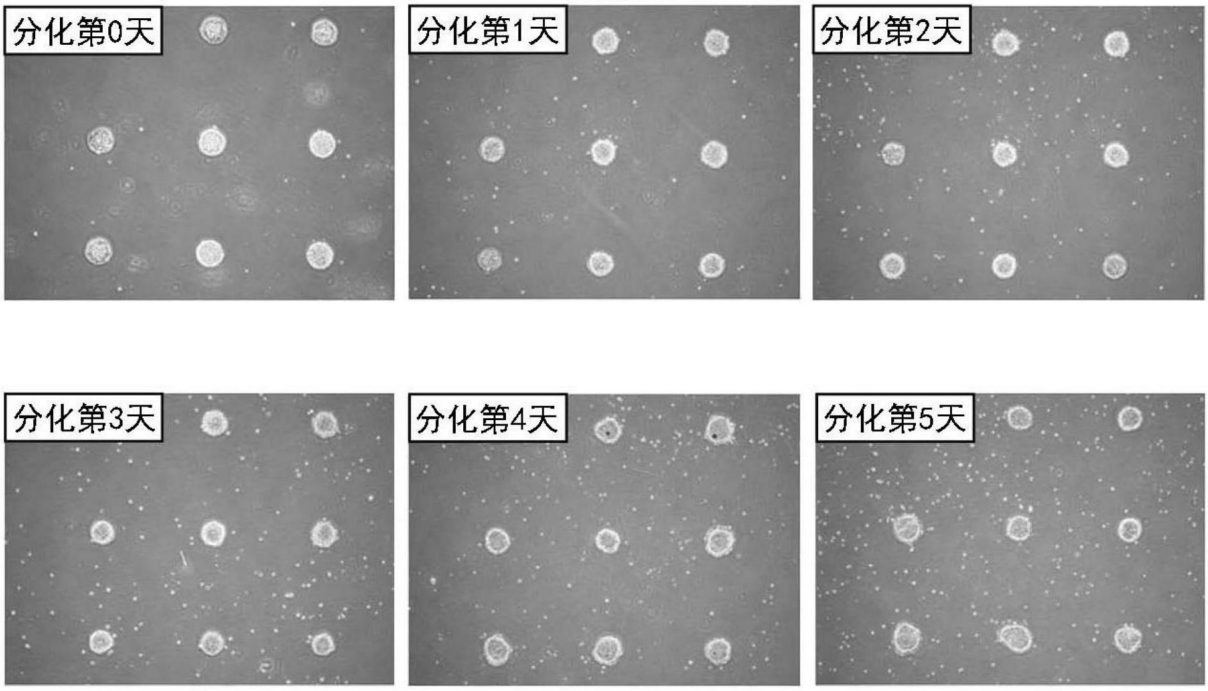

分化第0天
分化第1天
分化第2天
分化第3天
分化第4天
分化第5天

图3

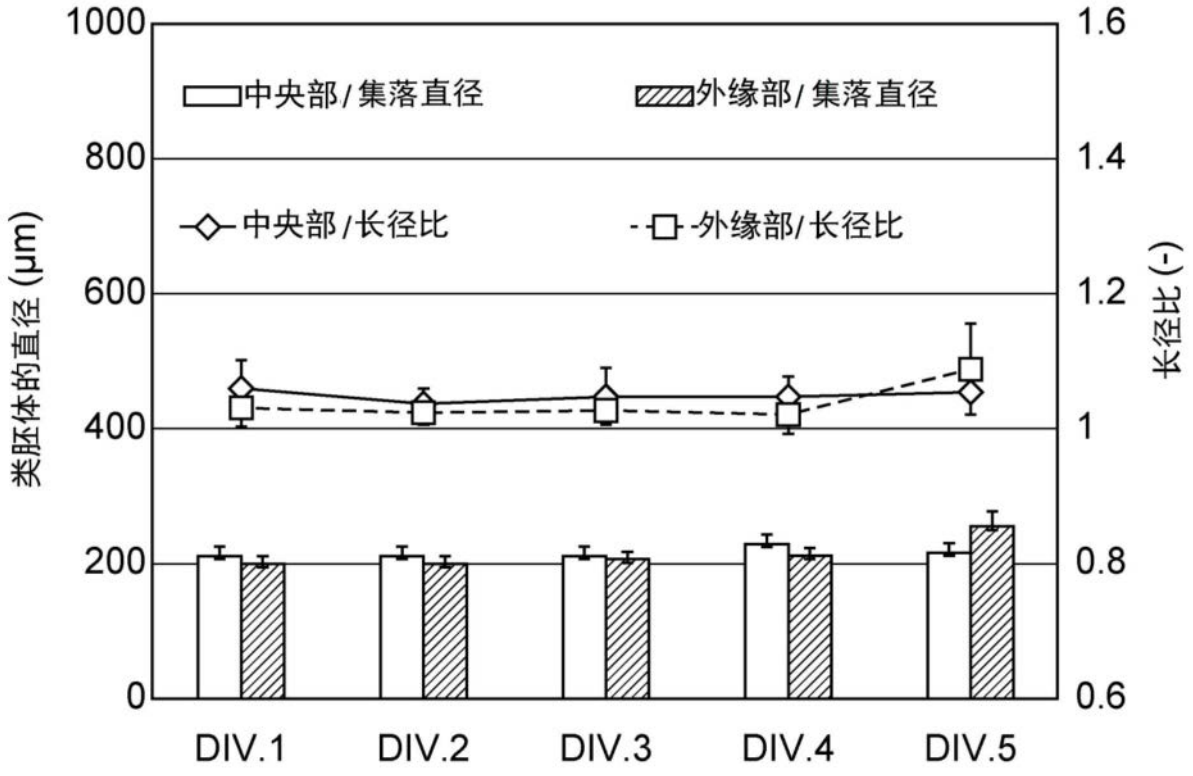

1000
800
600
400
200
0
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
中央部/集落直径
外缘部/集落直径
中央部/长径比
外缘部/长径比
类胚体的直径 (μm)
长径比 (-)
DIV.1
DIV.2
DIV.3
DIV.4
DIV.5

图4

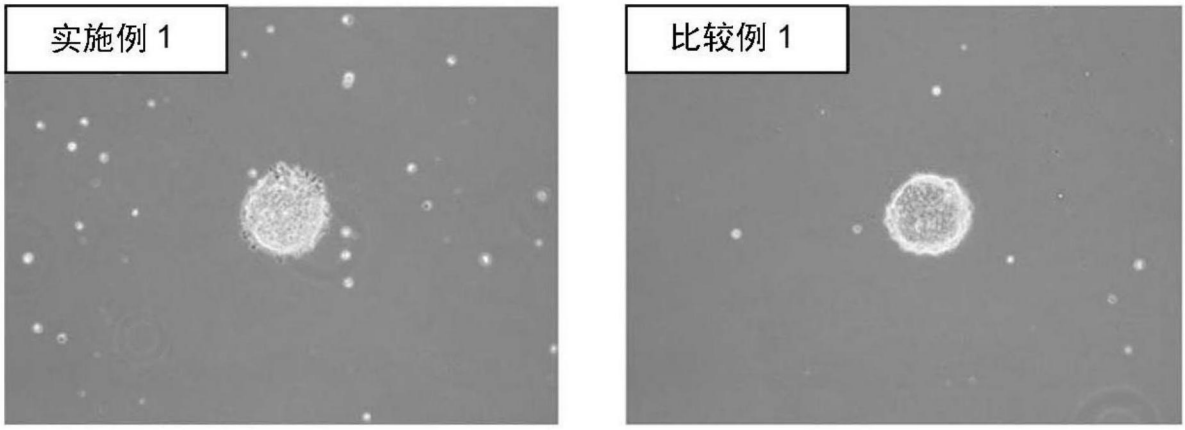


图5

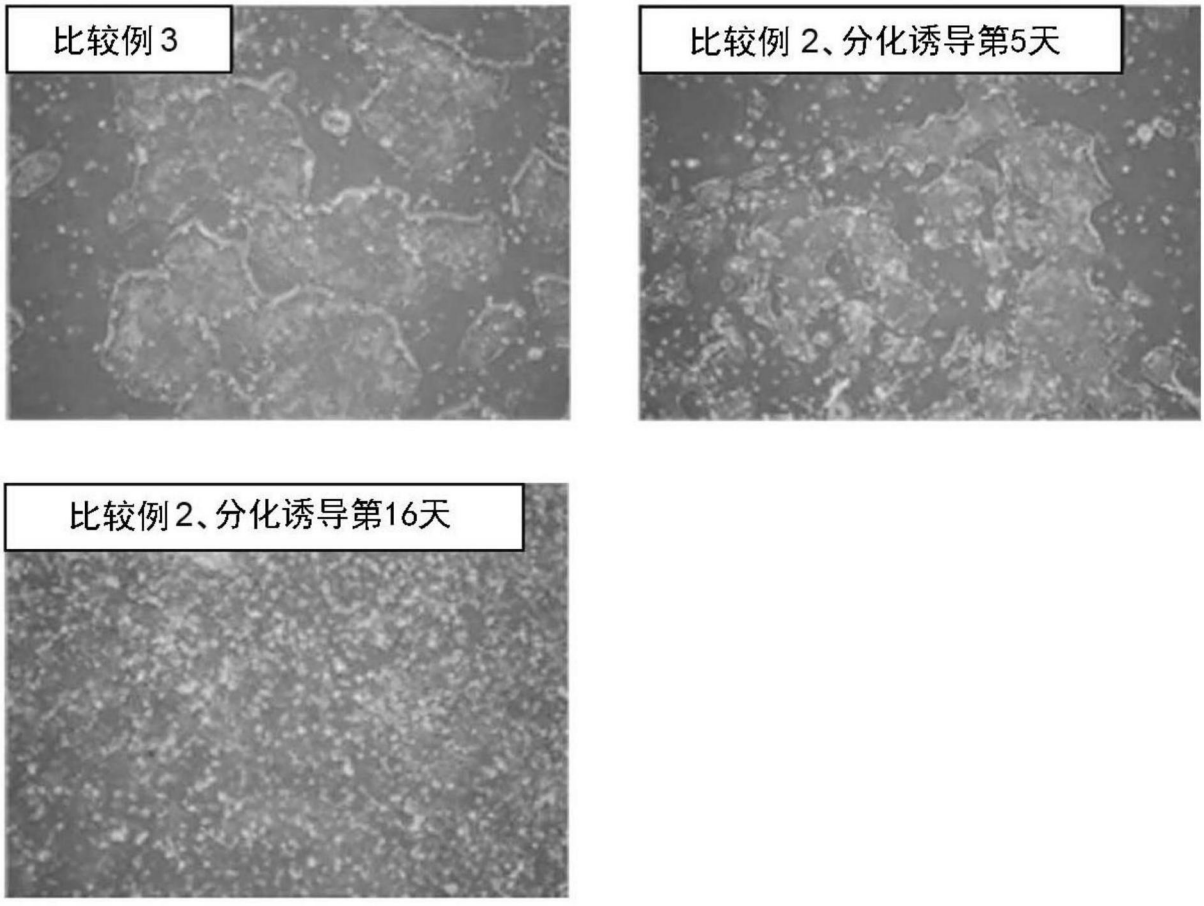


图6

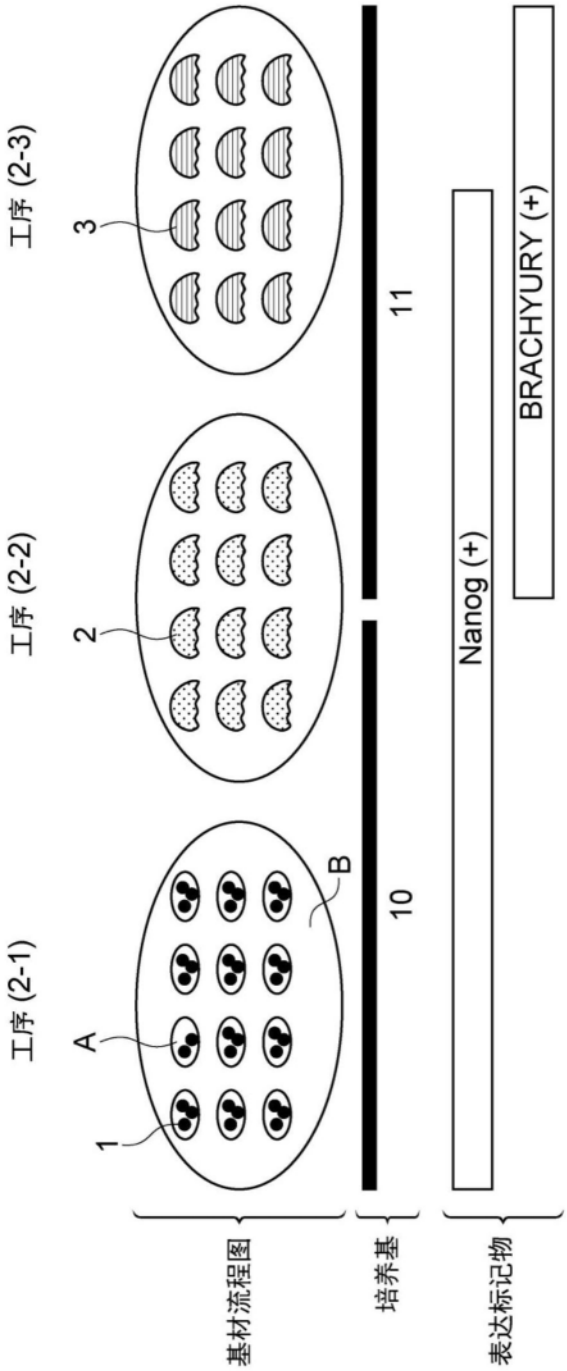


图7

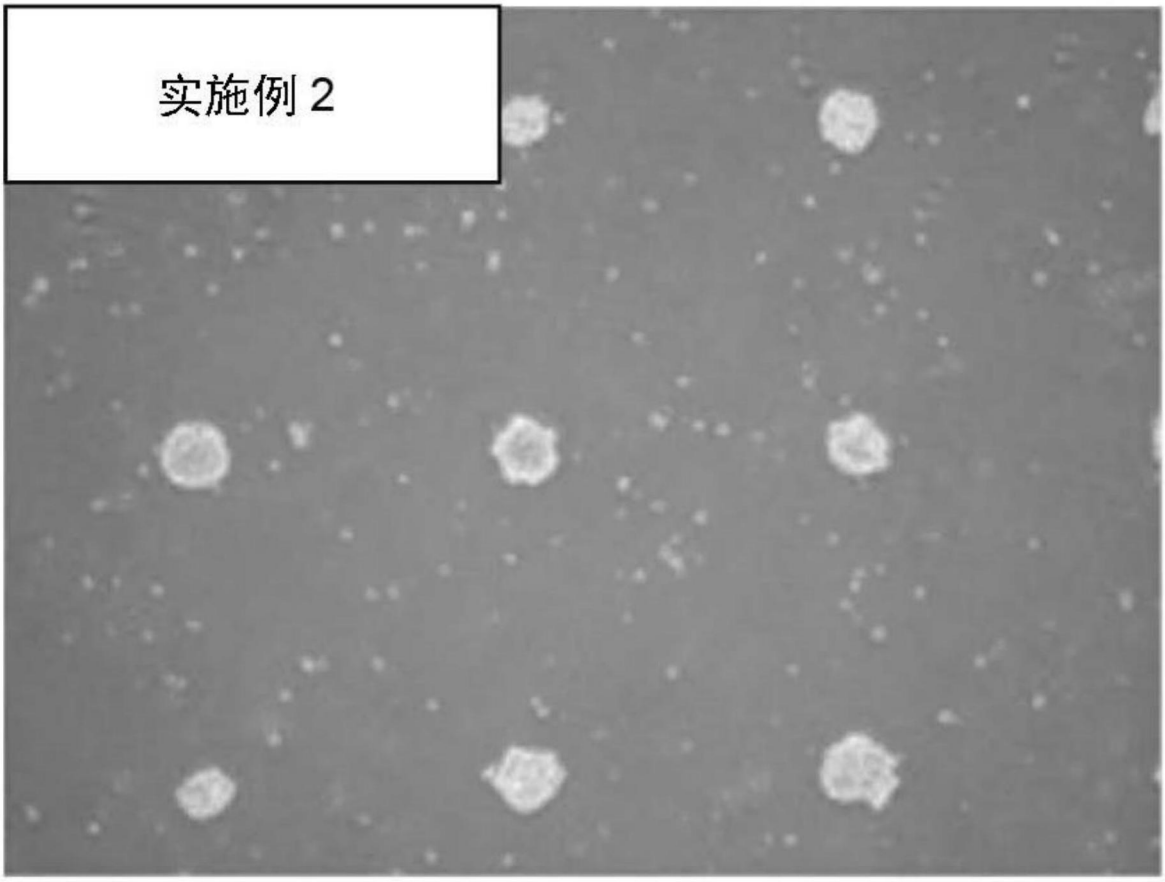


图8

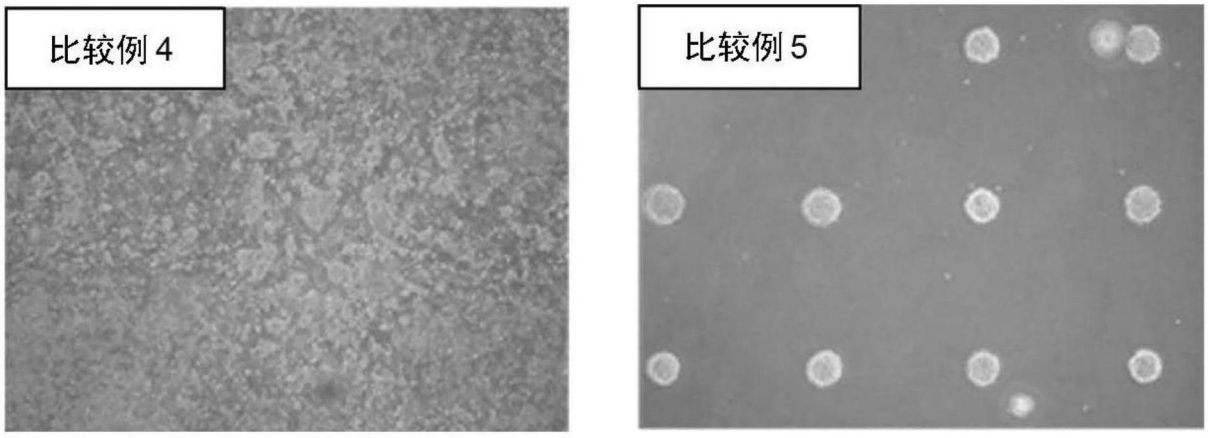


图9

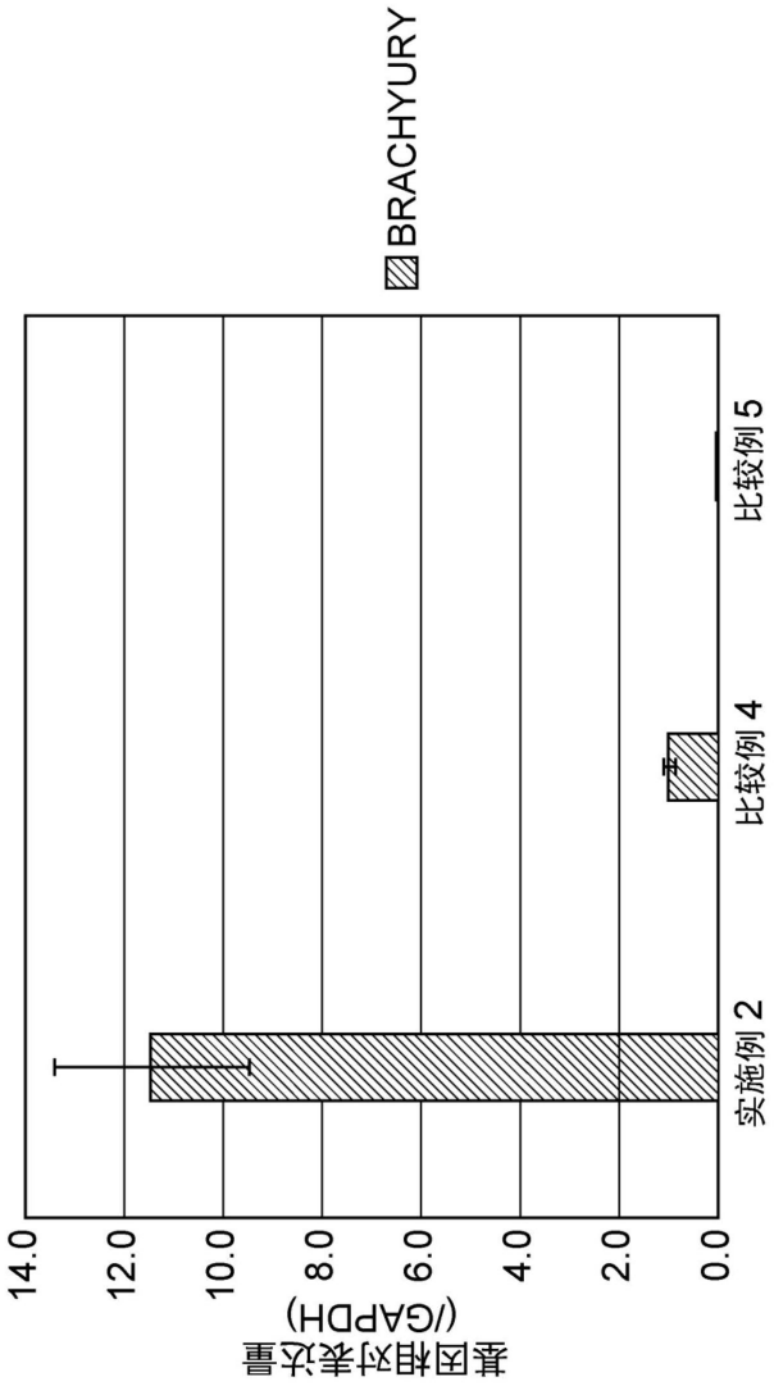

BRACHYURY
基因相对表达量
(/GAPDH)
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
实施例 2
比较例 4
比较例 5

图10

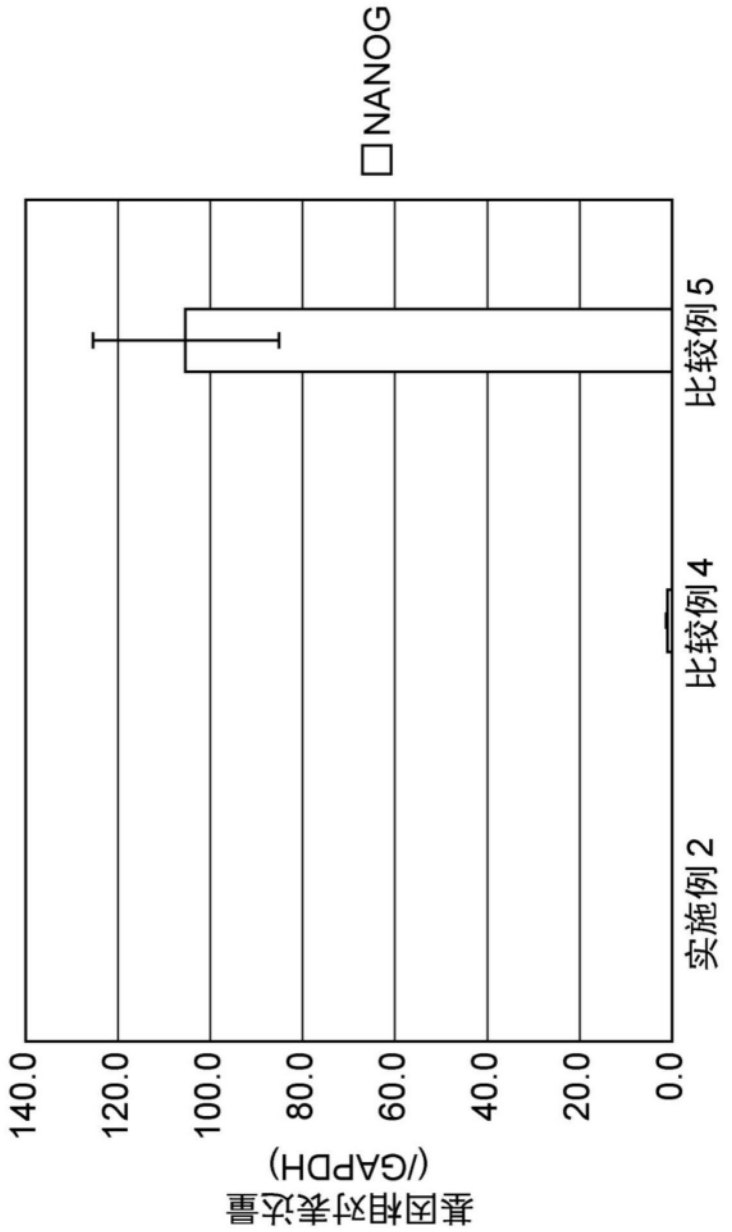

NANOG
基因相对表达量
(/GAPDH)
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
实施例2
比较例4
比较例5

图11

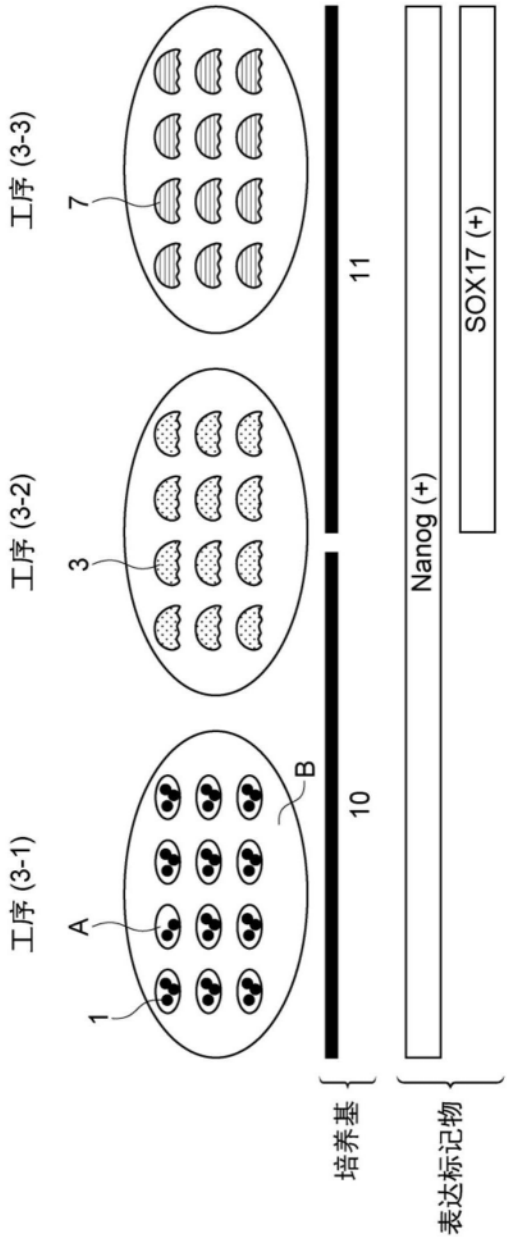


图12

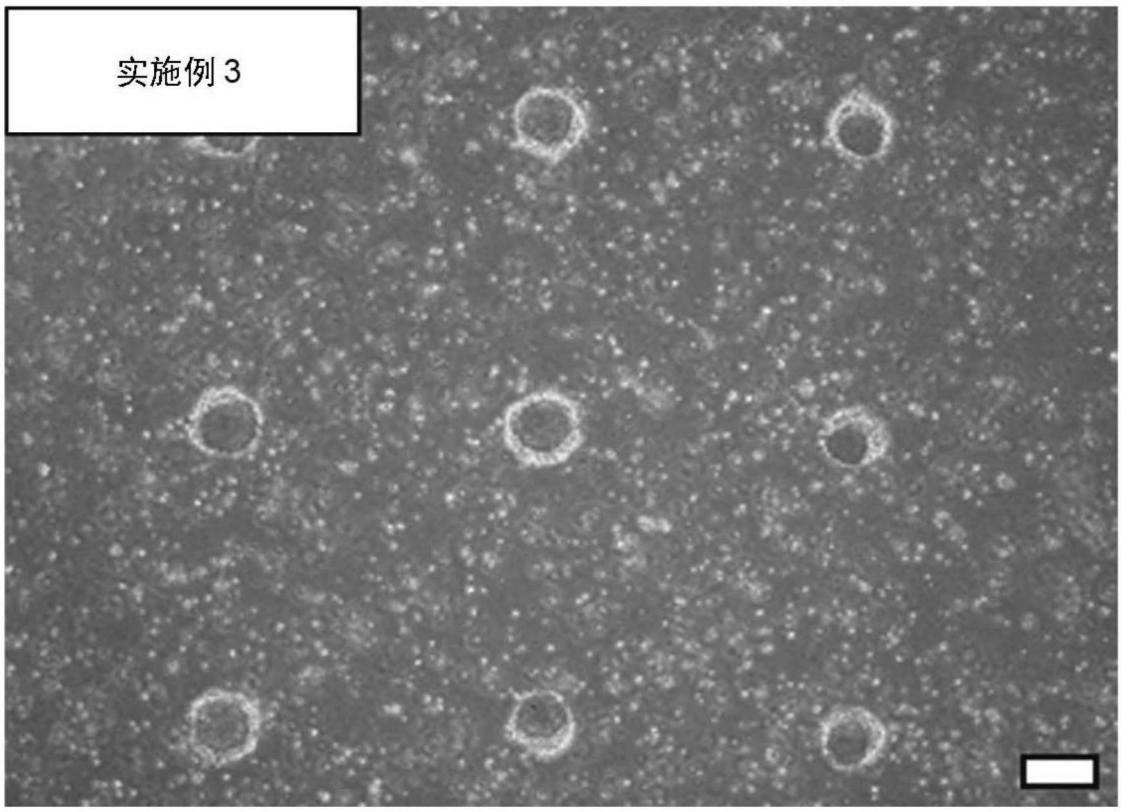


图13

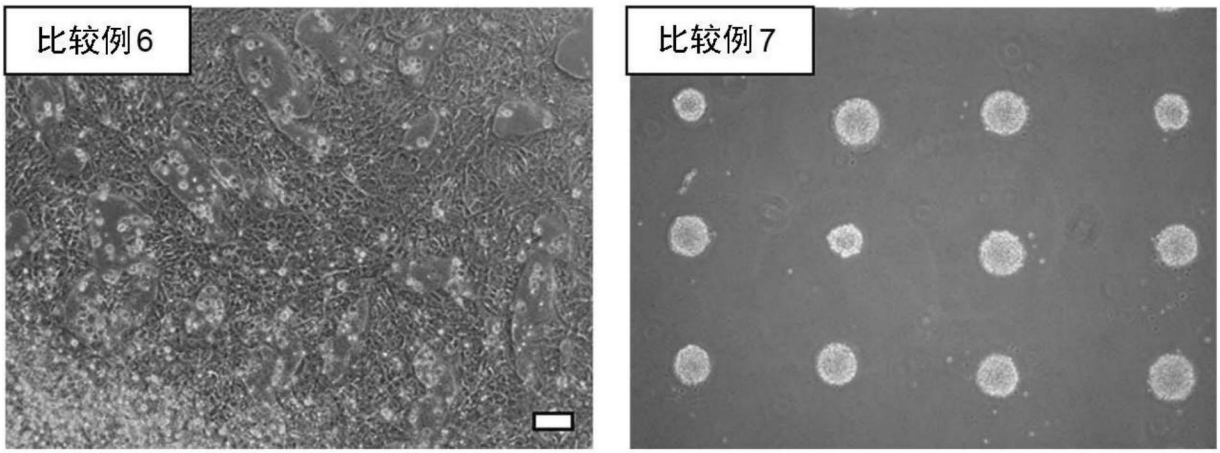


图14

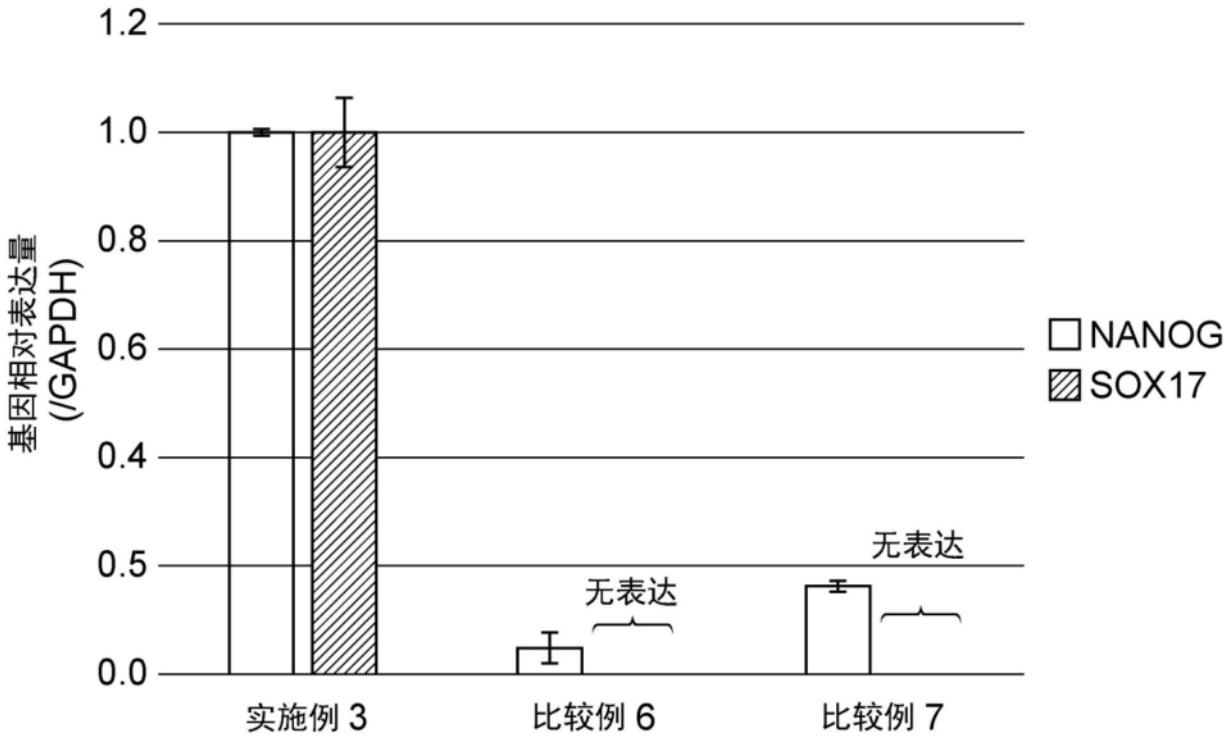

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.5
0.0
基因相对表达量
(/GAPDH)
NANOG
SOX17
无表达
无表达
实施例 3
比较例 6
比较例 7

图15

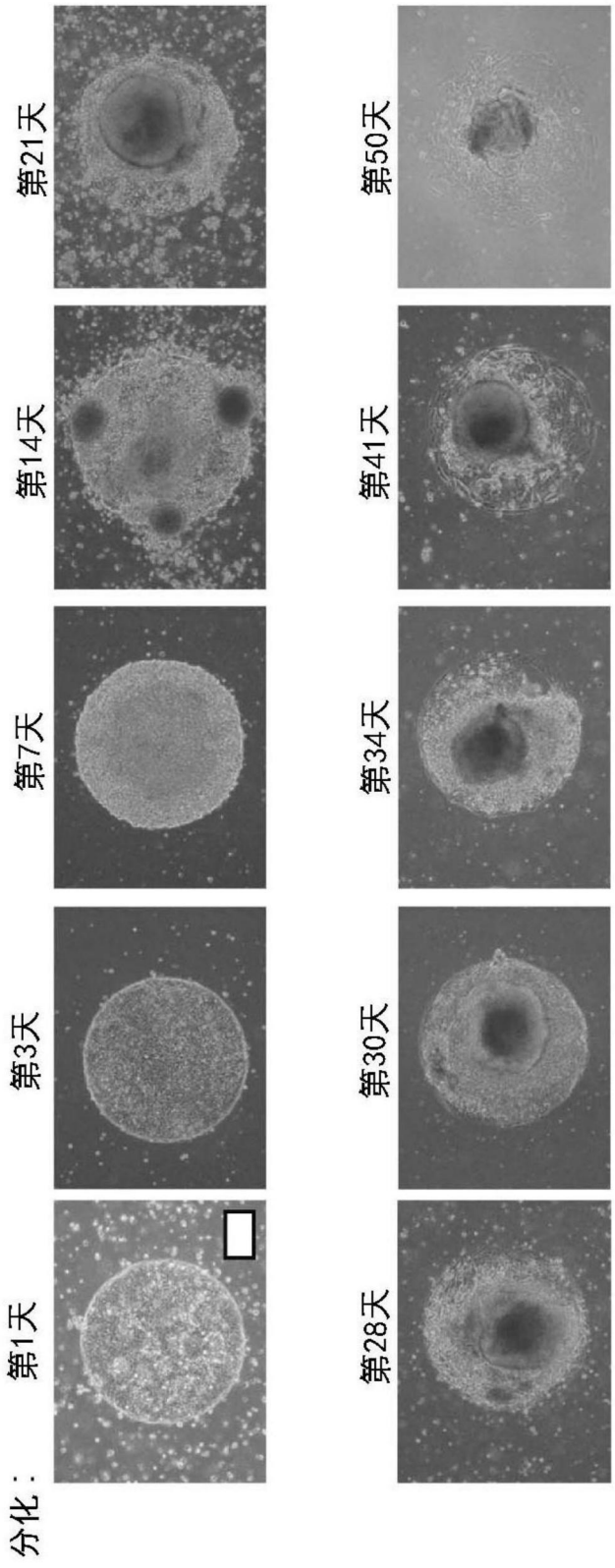


图16

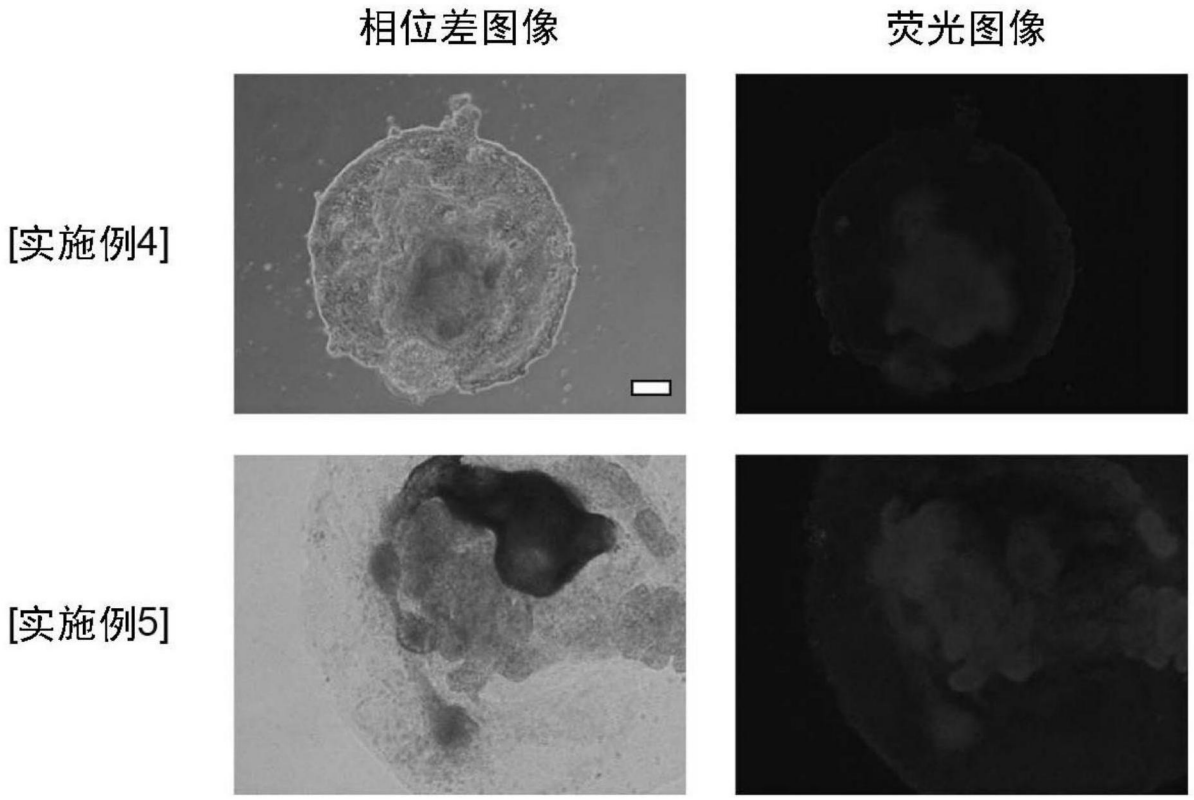


图17

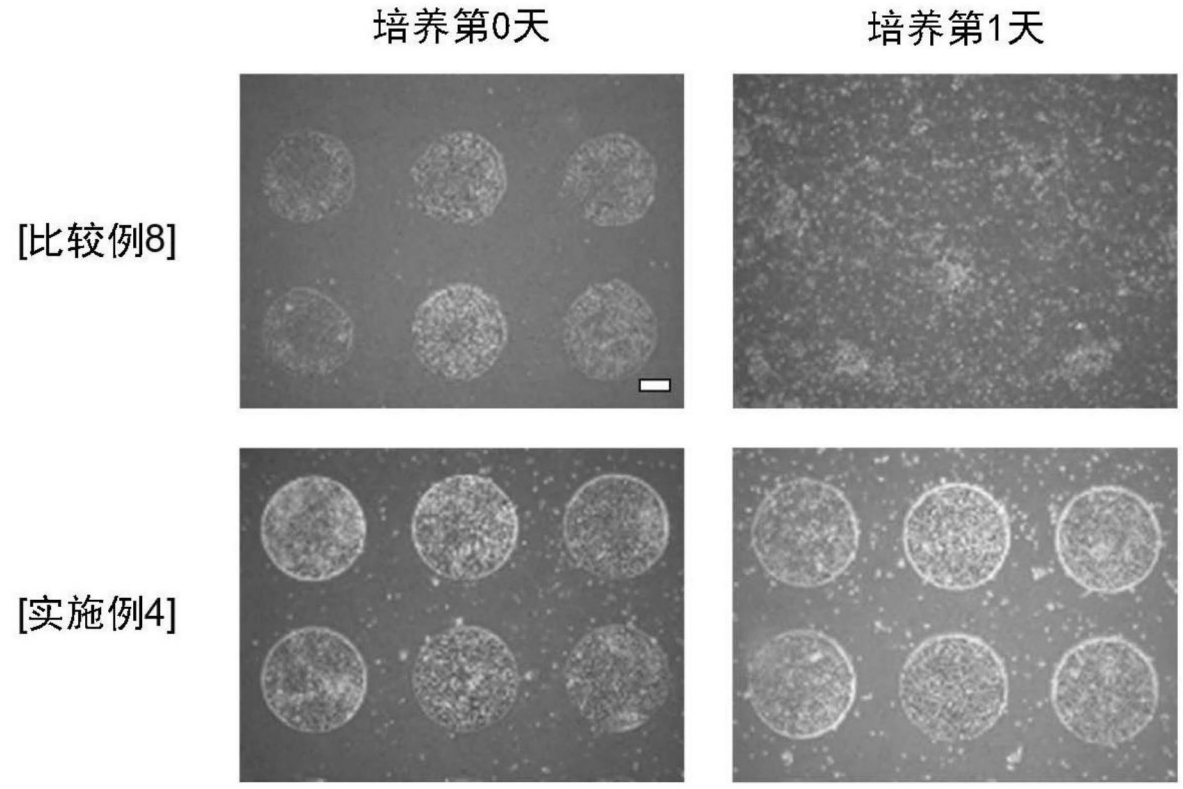


图18

[比较例9]

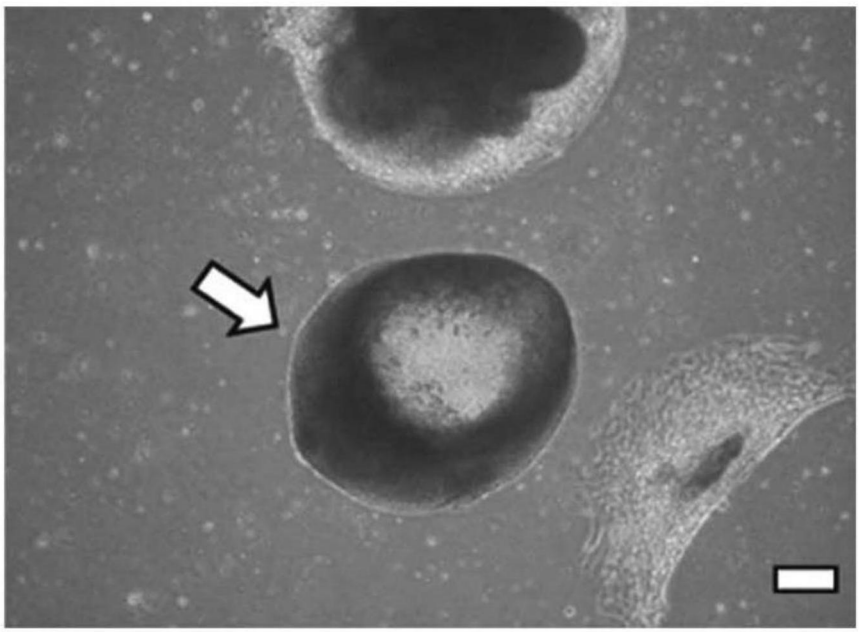


图19