

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年10月29日(29.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/218579 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/0789 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/017839

(22) 国際出願日: 2020年4月24日(24.04.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-086767 2019年4月26日(26.04.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 齋藤 潤 (SAITO, Megumu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 丹羽 明 (NIWA, Akira); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 杉村 竜一 (SUGIMURA, Ryoichi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 太田 諒 (OTA, Ryo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PLURIPOTENT STEM CELLS CONDITIONED FOR INDUCTION OF DIFFERENTIATION

(54) 発明の名称: 分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing pluripotent stem cells that are conditioned for the induction of differentiation, the method comprising: a step (A1) of forming spherical cell masses in the individual recesses of a culture container, by subjecting pluripotent stem cells to suspension culture for 6 to 48 hours, the culture container having a nonadhesive or low-adhesive culture surface as an interior bottom surface, the culture surface having a plurality of recesses that are identical to each other and densely disposed so as to abut each other, each of the recesses having an inner wall surface that forms a funnel-shaped inclined surface and having a bottom surface that forms a recess-shaped curved surface that smoothly connects to the inner wall surface; and a step (A2) of subjecting the spherical cell masses obtained in step (A1) to flat adhesion culture. The present invention also provides a method for producing differentiated cells, the method comprising a step (B1) of subjecting the conditioned pluripotent stem cells provided by the aforementioned method to adhesion culture in a medium that induces differentiation to a predetermined differentiated cell (for example, hemogenic endothelial cells); and a step (B2) of selecting, from a cell population containing the predetermined differentiated cells and yielded by the step (B1), the differentiated cells using as an indicator a differentiation marker specific for the differentiated cells. The present invention further provides a method for producing differentiated cells (for example, hematopoietic progenitor cells) by the further differentiation of the selected differentiated cells (for example, hemogenic endothelial cells).

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：本発明は、分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法であって、（A 1）非接着性もしくは低接着性の培養面を内部底面として有する培養容器であって、前記培養面には、互いに同一の複数の凹部が互いに隣り合うよう密に配置され、各凹部は、漏斗状の斜面となっている内壁面と、該内壁面に滑らかに接続された凹状の曲面となっている底面とを有する、前記培養容器を用いて、多能性幹細胞を6～48時間浮遊培養し、各凹部内に球状細胞塊を形成させる工程；並びに（A 2）工程（A 1）で得られた球状細胞塊を平面接着培養する工程を含む、方法を提供する。本発明はまた、（B 1）前記方法により得られた、馴化された多能性幹細胞を、所定の分化細胞（例、造血性内皮細胞）への分化を誘導する培地中で接着培養する工程；並びに（B 2）工程（B 1）で得られた所定の分化細胞を含む細胞集団から、該分化細胞に特有の分化マーカーを指標として、該分化細胞を選別する工程を含む、該分化細胞の作製方法、さらに、該選別された分化細胞（例、造血性内皮細胞）をさらに分化させることによる分化細胞（例、造血前駆細胞）の作製方法を、提供する。

明 細 書

発明の名称：

分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、分化誘導のための多能性幹細胞の馴化（コンディショニング）方法、該方法により馴化された多能性幹細胞からの接着培養による分化誘導と分化マーカーを用いたソーティングとを組み合わせた分化細胞の純化方法等に関する。

背景技術

[0002] 多能性幹細胞（PSC）を様々な細胞種へと分化させるには、モルフォゲンへの段階的な曝露により胚の発生を模倣する、マスター転写因子を強制的に発現させる、あるいはそれらを組み合わせるといったアプローチがとられている。例えば、ヒトPSCから造血前駆細胞（以下、「HPC」ともいう）を誘導する方法として、モルフォゲンによる血球分化誘導の途中で、造血を促進し得る転写因子を組み合わせることで導入することにより、HPCを誘導する方法が報告されている（非特許文献1）。

[0003] HPC誘導は、PSCからの造血性内皮細胞（HE）の誘導と、それに続くHPC誘導の2段階に大別され、前者はさらに、ストックしていたPSCを分化誘導に供するために馴化（コンディショニング）する工程と、馴化されたPSCをHEに分化誘導する工程とに分けられる。将来の患者への細胞治療を考えた場合、十分な細胞数を安定に得るためには、HPC分化誘導の基礎となるHEを、高純度かつ大量に、安定して供給し得る培養系の確立が必須である。

[0004] 現在、PSCからのHPC分化誘導は、Gordon Kellerらによる胚様体形成法の変法（非特許文献1及び2）がスタンダードとなっているが、以下の点により細胞治療への発展は困難な状況にある。

（1）胚様体（EB）のサイズと密度のバラつきにより、安定した産生が困難である。

(2) EB形成により、分化誘導途中で細胞を十分に解離させることが難しく、磁気活性化細胞分離 (MACS) によって高純度なHEを安定に得ることが困難である。

(3) HEからHPCへ分化誘導を行う際の培養条件が最適化されておらず、誘導効率が低い。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Sugimura et al., Nature, 545: 432-438 (2017)

非特許文献2: Ditadi et al., Nat. Cell Biol., 17(5): 580-591 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 従って、本発明の目的は、上記3つの課題を解決し、臨床応用が可能な程度に大量のHPCを安定にかつ低コストで産生し得る、PSCからHPCを作製する培養系を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らはまず、上記(1)の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、EBのサイズと密度のバラつきを改善するには、PSCのコンディショニングが重要であると考えた。従来は、ストックしていたPSCコロニーの中から正常なコロニーをピックアップして未分化維持培地に継代して接着培養し、成長したコロニーから正常なものを選別してEB形成・分化誘導に供しており、コンディショニングに1週間程度要していた。しかし、この方法では、コロニー間でサイズが異なり、分化誘導にバラつきが出るといった問題があった。そこで、本発明者らは、ヒトiPS細胞から均一なサイズの胚様体を効率よく形成させ得ることが報告されている微細加工培養容器EZSPHERE (登録商標; AGCテクノグラス社) (Sci. Rep., 6: 31063 (2016)、WO 2017/047735、WO 2017/164257、Nature, 545: 432-438 (2017)) を、それよりも前段階であるPSCのコンディショニングのために使用した。即ち、ストックしていたPSCコロニーの中

から正常なコロニーを一旦未分化維持培地で接着培養した後、単一細胞に解離してEZSPHERE（登録商標）に播種し、短期間（1日程度）培養した。その結果、全体に未分化状態を維持した、サイズ・細胞数が均一な球状iPS細胞塊を高密度に作製することに成功した。

[0008] 次に、本発明者らは、上記（2）の課題に対して、得られた球状iPS細胞塊を浮遊培養ではなく平面接着培養に供したところ、該細胞塊は自発的に扁平化し、略2次元構造をとった。培地をHE分化誘導培地に交換して培養した後、細胞塊をディッシュから剥離し、解離処理を行って、CD34陽性を指標とするMACSに供した。その結果、細胞塊を効率よく解離させることができ、高純度のHEを安定に取得することに成功した。さらに、平面接着培養後の細胞塊からHEを純化せずとも、その後の分化誘導培養により、効率よくHEをHPCに変換し得ることも見出した。

[0009] さらに、本発明者らは、上記（3）の課題に対して、特定の培地組成と細胞外マトリクスとの組み合わせを用いることにより、HEをHPCに効率よく安定に変換することに成功した。

[0010] 以上の工夫により、従来法では、5回に1回程度しか効率よくHPCを誘導することができなかったのに対し、本発明者らの方法によれば、5回中3～4回の確率でHPCへの分化誘導を達成する安定で再現性の高い分化誘導系の構築に成功した。

[0011] 上記プロトコルの中でも、PSCのコンディショニングの工程にEZSPHERE（登録商標）による短期間の浮遊培養を採用したことにより、均一で品質に優れた馴化PSCを提供できるようになったことが、HPCを安定かつ大量に誘導し得る培養系の構築に大きく寄与していると考えられた。従来は、PSCを球体（スフェロイド）の状態にすると分化し易いというのが技術常識であった。PSCのコンディショニングは、未分化状態を維持したまま、PSCを分化誘導に適した状態にリフレッシュすることであるから、当該工程にEZSPHERE（登録商標）を用いることは、全く予想外の発想であった。本発明者らは、この浮遊培養の期間を6～48時間、例えば1日程度の短期間とすることで、PSCの未分化状態

を維持したままで、サイズ・細胞数が揃った球状PSC塊を大量かつ安定に作製することに成功したのである。

従って、EZSPHERE（登録商標）を用いたPSCのコンディショニングは、HPC等の中胚葉系列の細胞のみならず、内胚葉・外胚葉系列の細胞への分化誘導にも広く応用可能である。また、EZSPHERE（登録商標）を用いた浮遊培養により得られる球状PSC塊を平面接着培養して、該細胞塊を略2次元構造に変化させてから分化誘導を行うことにより、目的の分化細胞を自体公知のソーティング技術により効率よく純化することができるので、当該技術を組み合わせることにより、任意の分化細胞をより安定かつ大量に取得することが可能となる。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0012] 即ち、本発明は以下のものを提供する。

[1] 分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法であって、

(1) 非接着性もしくは低接着性の培養面を内部底面として有する培養容器であって、前記培養面には、互いに同一の複数の凹部が互いに隣り合うように密に配置され、各凹部は、漏斗状の斜面となっている内壁面と、該内壁面に滑らかに接続された凹状の曲面となっている底面とを有する、前記培養容器を用いて、多能性幹細胞を6～48時間浮遊培養し、各凹部内に球状細胞塊を形成させる工程；並びに

(2) 工程(1)で得られた球状細胞塊を平面接着培養する工程を含む、方法。

[2] 前記工程(1)に供する多能性幹細胞が、既知組成の細胞外マトリクスでコーティングした培養容器を用いて接着培養されたものである、[1]に記載の方法。

[3] 細胞外マトリクスがラミニンもしくはその断片である、[2]に記載の方法。

[4] 多能性幹細胞が胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞である、[1]～[

3] のいずれかに記載の方法。

[5] 多能性幹細胞がヒト由来である、[1] ～ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] 多能性幹細胞から所定の分化細胞を作製する方法であって、

(1) [1] ～ [5] のいずれかに記載の方法により得られた、馴化された多能性幹細胞を、該分化細胞への分化を誘導する培地中で接着培養する工程；並びに

(2) 工程(1)で得られた所定の分化細胞を含む細胞集団から、該分化細胞に特有の分化マーカーを指標として、該分化細胞を選別する工程を含む、方法。

[7] 前記工程(2)が磁気活性化細胞分離により行われる、[6]に記載の方法。

[8] 所定の分化細胞が中胚葉系の細胞である、[6]又は[7]に記載の方法。

[9] 所定の分化細胞が血液細胞又はその前駆細胞である、[8]に記載の方法。

[10] 前駆細胞が造血性内皮細胞又は造血前駆細胞である、[9]に記載の方法。

[11] 造血前駆細胞の作製方法であって、

(1) [10]に記載の方法により得られた、選別された造血性内皮細胞を提供する工程；並びに

(2) 該造血性内皮細胞を造血前駆細胞に分化誘導する工程を含む、方法。

[12] 前記工程(2)が、造血性内皮細胞を、フィブロネクチン、ラミニンもしくはその断片でコーティングした培養容器を用い、Stemline（登録商標）Stemline II培地を基礎培地とする分化誘導培地中で培養することにより行われる、[11]に記載の方法。

[13] 所定の分化細胞が、骨格筋細胞、軟骨細胞、腎細胞、心筋細胞もし

くは脂肪細胞、又はその前駆細胞である、〔 8 〕に記載の方法。

〔 1 4 〕 所定の分化細胞が外胚葉系もしくは内胚葉系の細胞である、〔 6 〕又は〔 7 〕に記載の方法。

〔 1 5 〕 外胚葉系の細胞が、神経系細胞、感覚系細胞もしくは表皮系細胞、又はその前駆細胞である、〔 1 4 〕に記載の方法。

〔 1 6 〕 内胚葉系の細胞が、膵 β 細胞、肝細胞、腸管細胞、肺細胞もしくは甲状腺細胞、又はその前駆細胞である、〔 1 4 〕に記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明のPSCコンディショニング法によれば、従来より短期間（4日程度）で、サイズ・密度が均一な球状PSC塊を得ることができる。さらに、その後に分化誘導処理をほどこした細胞の解離が容易となるため、途中でMACS等の細胞選別を組み合わせることにより、所望の分化細胞を大量かつ安定に作製することができる。特に、HEを経由したHPCの分化誘導においては、CD34陽性にしたHEの選別と、その後の最適化された培養条件とを組み合わせることで、従来よりも飛躍的にHPCの誘導効率を改善することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]（A）本発明のPSCコンディショニング法に用いられる微細加工培養容器の断面図、及び（B）該培養容器の製造から該培養容器を用いた球状PSC塊の調製の様子を模式的に示した図である（Sci. Rep., 6: 31063 (2016)のSupplementary Fig. 2から一部改変して転載）。

[図2]本発明のPSCコンディショニング法の模式図である。iMatrix-511上、mTeSR1培地中で維持したPSCを、-4日目（HEへの分化誘導開始日を0日目とした）にディッシュから剥離、TrypLE Express単一細胞にまで解離した後、Y-27632を添加したmTeSR1培地中に播種し、一晚培養して球状細胞塊を形成させた。-3日目に球状細胞塊をiMatrix-511上、mTeSR1培地中に播種し、3日間培養した。0日目に球状細胞塊は自発的に扁平化し、略2次元構造となった。

[図3]（A）実施例1で用いたHE及びHPCの分化誘導法の模式図である。0日目に培地をCHIR99021、BMP4及びVEGF 165を含むEssential 8に置換し、5% O_2 ・5

% CO₂インキュベーター中で培養した。分化開始から2日目に培地をSB431542、VEGF 165及びSCFを含むEssential 6に置換した。4日目にHEを富化すべくCD34陽性細胞をMACSで選別し、フィブロネクチン上、SCF、TPO、Flt-3L及びIL-6/IL-6R α 、ITS-X及びGlutamaxを添加したStemline（登録商標）Stemline II培地中で6日間培養した。（B）MACSで選別・富化されたHE含有細胞集団のフローサイトメトリープロットである。

[図4]（A）造血性カクテルで刺激後7日目における造血前駆細胞の代表的な位相差像である。（B）造血性カクテルで刺激後7日目における培養全体の代表的なCD45及びCD34のフローサイトメトリープロットである。（C）分化誘導開始から11日目の造血前駆細胞からCFUアッセイにより生じた顆粒球／マクロファージ前駆細胞の代表的な位相差像である。（D）CFUアッセイにより生じた顆粒球／マクロファージ前駆細胞（CFU-M、CFU-G、CFU-GM）のコロニー形成単位を示す。

[図5]実施例2で用いたPSCのコンディショニング、並びにHE、HPC及び種々の血液細胞の分化誘導法の模式図である。実施例1と同様にPSCのコンディショニング及び造血性誘導（中胚葉分化）を行ったのち、分化4日目時点での細胞回収もCD34陽性細胞の選別も行うことなく分化誘導を継続した。分化開始から4日目以降は、目的とする細胞の種類に応じ、以下のように異なるサイトカインの組み合わせを用いて培養を継続した。・造血前駆細胞の誘導（図6A）：分化開始4日目に培地をVEGF及びSCFを添加したStemline（登録商標）Stemline II培地へ変更して2日間培養した。分化開始6日目以後は、SCF、TPO、Flt-3L、ITS-X及びGlutamaxを添加したStemline（登録商標）Stemline IIに交換して4日間培養し、分化開始10日目に浮遊細胞分画中にCD34⁺CD45⁺造血前駆細胞を得た。・単球・マクロファージの誘導（図6B）：分化開始4日目に培地をVEGF及びSCFを添加したStemPro（登録商標）-34培地へ変更して2日間培養した。分化開始6日目以後は、SCF、TPO、Flt-3L、IL-3、M-CSFを添加したStemPro（登録商標）-34培地に交換して7-10日間培養した。その後さらにサイトカインをFlt-3L、GM-CSF、M-CSFの3種類に変更して7日間培養継続し、浮遊

細胞分画中にCD14⁺CX3CR1⁺単球細胞を得た。・赤芽球系・骨髓球系細胞の誘導（図6C）：分化開始4日目に培地をVEGF及びSCF、TP0、Flt-3L、IL-3、IL-6、EP0を添加したStemline（登録商標）Stemline II培地へ変更して2日間培養した。分化開始6日目以後は、SCF、TP0、Flt-3L、IL-3、IL-6、EP0を添加したStemline（登録商標）Stemline IIに交換して3日間培養した。分化開始9日目に浮遊細胞を回収し、細胞選別を行わずそのまま新しい培養皿へ移して同組成の培地で培養を7日間継続した後、CD235⁺CD33⁻赤芽球細胞とCD235⁻CD33⁺骨髓球系細胞を得た。・NK細胞の誘導（図6D）：分化開始4日目に培地をSCFおよびFlt-3Lを添加したStemline（登録商標）Stemline II培地へ変更して8日間培養した。分化開始12日目以後にSCF、Flt-3L、IL-7、IL-15を添加したStemline（登録商標）Stemline II培地に交換して36日間培養した後、CD56⁺CD314⁺NK細胞を得た。

[図6]実施例2における、（A）分化開始から10日目の造血前駆細胞（CD34陽性及びCD45陽性）への分化を示すフローサイトメトリープロット、並びに、（B）分化開始から21日目の単球・マクロファージ（CX3CR1陽性及びCD14陽性）、（C）分化開始から16日目の赤芽球系（CD235a陽性及びCD33陰性）、骨髓球系（CD235a陰性及びCD33陽性）及び（D）分化開始から48日目のNK細胞（CD314陽性及びCD56陽性）への分化を示すフローサイトメトリープロットである。

発明を実施するための形態

[0015] （I）分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法

本発明は、分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法（以下、「本発明のPSCコンディショニング法」という）を提供する。

ここで「PSCの馴化（コンディショニング）」とは、PSCを分化誘導にかけるときに、出発のPSCを未分化性を維持したままリフレッシュすることを意味する。凍結保存していたPSCストックは、解凍後平面培地で接着培養して起眠させ、正常なコロニーをピックアップして分化誘導に用いるが、起眠後直ちに分化誘導に供すると細胞の生存率や分化効率が低いため、コンディショニング

グを行って分化誘導に適した状態にしてから、分化誘導に供するのが一般的である。従来は、起眠したPSCを平面培地に継代して未分化維持培地中で接着培養し、未分化性を維持したコロニーがある程度形成した時点で、正常なコロニーを選別して分化誘導に供していた。

[0016] 本発明のPSCコンディショニング法では、起眠したPSCを平面培地に継代することなく、同一の複数の微細な凹部（「マイクロウェル」ともいう）を有し、マイクロウェル表面が非接着性もしくは低接着性である、特殊な微細加工された培養容器中に播種し、短期間浮遊培養して球状細胞塊を形成させた後、該球状細胞塊を平面培地で接着培養することにより、自発的に扁平化させ、略2次元構造をとるようにする。

即ち、本発明のPSCコンディショニング法は、

（１）非接着性もしくは低接着性の培養面を内部底面として有する培養容器であって、前記培養面には、互いに同一の複数の凹部が互いに隣り合うよう密に配置され、各凹部は、漏斗状の斜面となっている内壁面と、該内壁面に滑らかに接続された凹状の曲面となっている底面とを有する、前記培養容器を用いて、多能性幹細胞を6～48時間浮遊培養し、各凹部内に球状細胞塊を形成させる工程；並びに

（２）工程（１）で得られた球状細胞塊を平面接着培養する工程を含む。

[0017] （a）PSCの準備

本発明で用いられるPSCは、未分化状態を保持したまま増殖できる「自己再生能」と三胚葉系列すべてに分化できる「分化多能性」とを有する未分化細胞であれば特に制限されず、例えば、胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹（iPS）細胞の他、始原生殖細胞に由来する胚性生殖（EG）細胞、精巣組織からのG S細胞の樹立培養過程で単離されるmultipotent germline stem (mGS) 細胞、骨髓から単離されるmultipotent adult progenitor cell (MAPC)、MUSE細胞等が挙げられる。ES細胞は体細胞から核初期化されて生じたES細胞であってもよい。好ましくはES細胞またはiPS細胞である。多能性幹細胞は哺乳動物に

由来するものであれば特に制限はないが、好ましくはヒト由来の多能性幹細胞である。

[0018] ES細胞は、哺乳動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485などに記載されている。

また、ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Research Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

[0019] iPS細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開W0 2007/069666)。ここで「体細胞」とは、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞(好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞)を意味し、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含さ

れるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（１）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（２）組織前駆細胞、（３）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0020] 得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが特に好ましい。ここでHLAの型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤などの使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの型が一致していることをいう。例えば、主たるHLA（例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座、あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座）が同一である場合などが挙げられる。

[0021] 初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。

[0022] PSCは、作製直後から本発明のPSCコンディショニング法により分化誘導のために馴化することもできるが、本発明のPSCコンディショニング法に供する前に、自体公知の方法により維持培養することができる。維持培養用の基本培地としては、例えば、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、最小必須培地（MEM）、Eagle

MEM培地、 α MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、及びこれらの混合培地などが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、市販の多能性幹細胞用の培地 (例、霊長類ES細胞培地、mTeSR1、StemFit AK02N、StemFit AK03N、Essential 8等) を用いてもよい。

[0023] 培地は、血清含有培地又は無血清培地であり得る。好ましくは、無血清培地が使用され得る。無血清培地 (SFM) とは、未処理又は未精製の血清をいずれも含まない培地を意味し、従って、精製された血液由来成分又は動物組織由来成分 (増殖因子など) を含有する培地が挙げられ得る。血清 (例えば、ウシ胎児血清 (FBS)、ヒト血清など) の濃度は、0~20%、好ましくは0~5%、より好ましくは0~2%、最も好ましくは0% (すなわち、無血清) であり得る。SFMは任意の血清代替物を含んでもよく、又は含まなくてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン (例えば、脂質リッチアルブミン、組換えアルブミン等のアルブミン代替物、植物デンプン、デキストラン及びタンパク質加水分解物等)、トランスフェリン (又は他の鉄輸送体)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロールあるいはこれらの均等物などを適宜含有する物質が挙げられ得る。かかる血清代替物は、例えば、WO 98/30679に記載の方法により調製できる。また、より簡便にするため、市販のものを利用できる。かかる市販の物質としては、Knockout (商標) Serum Replacement (KSR)、Chemically-defined Lipid concentrated、及びGlutamax (Invitrogen) が挙げられる。

[0024] 培地は、自体公知のその他の添加物を含んでもよい。例えば、成長因子 (例えば、インスリンなど)、ポリアミン類 (例えば、プトレシンなど)、ミネラル (例えば、セレン酸ナトリウムなど)、糖類 (例えば、グルコースなど)、有機酸 (例えば、ピルビン酸、乳酸など)、アミノ酸 (例えば、非必須アミノ酸 (NEAA)、L-グルタミンなど)、還元剤 (例えば、2-メルカプ

トエタノールなど）、ビタミン類（例えば、アスコルビン酸、d-ビオチンなど）、ステロイド（例えば、[ベータ]ーエストラジオール、プロゲステロンなど）、抗生物質（例えば、ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシンなど）、緩衝剤（例えば、HEPESなど）、栄養添加物（例えば、B27 supplement、N2 supplement、StemPro（登録商標）ーNutrient Supplementなど）を挙げることができる。各添加物は自体公知の濃度範囲で含まれることが好ましい。

[0025] PSCは、フィーダー細胞の存在下又は非存在下にて培養されてよいが、ヒトへの臨床応用を考慮すれば、PSCはフィーダー細胞の非存在下で培養されることが望ましい。従って、本発明の好ましい実施態様において、PSCは無フィーダー条件下で培養される。

[0026] PSCを維持培養するために使用される培養容器は、特に限定されないが、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、及びローラーボトルが挙げられ得る。培養容器は細胞接着性であり得る。細胞接着性の培養容器は、培養容器表面の細胞への接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス（ECM）などの任意の細胞接着用基質でコートされたものであり得る。細胞接着用基質は、PSC又はフィーダー細胞（用いられる場合）の接着を目的とする任意の物質であり得る。細胞接着用基質としては、ラミニン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリ-L-オルニチン、及びフィブロネクチン並びにそれらの混合物、例えばマトリゲル、並びに溶解細胞膜調製物（lysed cell membrane preparations）が挙げられる（Klimanskaya I et al 2005, Lancet 365 : p1636-1641）。これらの細胞接着用基質は、それらの種類に応じて、通常PSCの培養に使用される濃度で培養容器にコーティングされる。

[0027] この培養において、PSCを上記培養容器上に播き、例えば、約 10^4 ~ 10^5 細胞

／cm²の細胞密度とし、1～10% CO₂／99～90%大気の雰囲気下、インキュベーター中で約30～40℃、好ましくは約37℃で培養することができる。

[0028] PSCを培養する工程において、培養期間の途中で培地交換を行うことができる。培地交換に用いられる培地は、培地交換前の培地と同じ成分を有する培地であっても、異なる成分を有する培地であってもよい。好ましくは、同じ成分を有する培地が用いられる。培地交換の時期は、特に限定されないが、新鮮な培地での培養を開始してから、例えば、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎に行われる。

[0029] 上記のようにして作製（及び維持）されたPSCは、自体公知の方法で凍結保存することができる。例えば、PSCを遠心チューブなどに回収し、細胞を遠心してペレット化した後、凍結保護剤を含んだ凍結保存液を加えて懸濁し、該懸濁液を凍結保存チューブに入れ、-80℃のフリーザーにて凍結後、気相もしくは液相の窒素タンクにて保存する方法などが挙げられるが、それに限定されない。凍結保護剤としては、例えば、DMSO、グリセリン、不凍タンパク質、不凍糖タンパク質等を適宜用いることができる。また、市販の凍結保存液（例、STEM-CELL BANKER）を用いることもできる。

[0030] 凍結保存したPSCの解凍方法も、当該技術分野で周知の方法を用いることができる（例えば、Freshney RI, Culture of Animal cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition, 2000, Wiley-Liss, Inc., Chapter 19を参照）。好ましくは、約37℃の湯浴中で急速解凍する。DMSOのような細胞毒性の強い凍結保護剤を使用している場合は、解凍後直ちに適当な希釈剤にてDMSO濃度を細胞に悪影響のない程度に希釈することが望ましく、遠心分離により上清を除去することで、毒性のある凍結保護剤等を除くことが望ましい。希釈剤としては、例えば、血清含有または不含培地のほか生理食塩水やPBSを用いることができる。

[0031] 解凍したPSCは、平面培地で接着培養することにより起眠させる。上清除去後の細胞ペレットをタッピングして崩し、未分化維持培地（例、霊長類ES細胞培地、mTeSR1、StemFit AK02N、StemFit AK03N、Essential 8等）（必要に

応じてROCK阻害剤（例、Y-27632）を添加してもよい）を添加して、ラミニン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリ-L-オルニチン、及びフィブロネクチン並びにそれらの混合物、例えばマトリゲル、並びに溶解細胞膜調製物（lysed cell membrane preparations）等の細胞接着用基質でコーティングした培養容器上に播種し、37℃、5% CO₂インキュベーター中で培養する。細胞接着用基質としては、PSCの未分化性維持のために、TGF β 等の種々の因子が混在しているマトリゲルや溶解細胞膜調製物等よりも、既知組成の細胞外マトリクス、例えば、ラミニン、フィブロネクチン及びそれらの断片、より好ましくはラミニンもしくはその断片（例えば、ラミニン511 E8断片（例、iMatrix-511））等を用いることが望ましい。培地交換は、継代翌日、その後1日おきに行うことができる。70～80%コンフルエントになるまで培養し、成長したコロニーをピックアップする。

[0032] (b) 微細加工培養容器

本発明のPSCコンディショニング法の工程（1）において使用する微細加工培養容器は、非接着性もしくは低接着性の培養面を内部底面として有する培養容器であって、前記培養面には、互いに同一の複数の凹部（マイクロウェル）が互いに隣り合うよう密に配置され、各凹部は、漏斗状の斜面となっている内壁面と、該内壁面に滑らかに接続された凹状の曲面となっている底面とを有することを特徴とする。

ここで「互いに同一の」とは、各凹部に同じ密度で細胞が播種された場合に、各凹部内で形成される球状細胞塊が互いに均一なサイズや細胞数を有する程度に、当該複数の凹部のサイズ（開口径、深さ等）や形状が互いに類似していることを意味し、厳密に同一である必要はない。本発明において、当該複数の凹部が「互いに同一サイズ」、「互いに同一形状」であるという場合には、それらのサイズ又は形状について上記と同様の意味で「同一」であることを意味する。

「密に配置される」とは、例えば、正方行列状の配置や、細密状（ハニカム状）の配置など、凹部の開口面積の合計が培養面に占める割合がより大き

くなるように（即ち、凹部同士の間の隔壁部分の占める割合がより小さくなるように）、凹部同士が可及的に互いに接近し隣り合うように配置される状態を意味する。

「漏斗状の斜面」とは、例えば、すり鉢の内部斜面のように、開口部から底面に向かうにつれて開口径が減少するような斜面である。

「凹状の曲面」とは、例えば、半球状の凹面やパラボラ状の凹面など、細胞の凝集を促進し得るように窪んだ曲面である。

[0033] 図1（A）に、本発明に用いられる微細加工培養容器の断面の拡大図を、また、図1（B）に、該微細加工培養容器の製造から、本発明のPSCコンディショニング法の工程（1）までの様子を模式的に示す。本発明に用いられる微細加工培養容器は、細胞の培養に通常使用される培養容器の底面に、レーザー照射（例、CO₂ガスレーザー）により複数の同一形状の微細な凹部（マイクロウェル）を密に配置して設けることにより製造される。培養容器の形状としては、例えば、ディッシュ（例、10mm、35mm、100mm等）やマルチウェルプレート（例、6-ウェル、96-ウェル等）などが挙げられるが、それらに限定されない。培養容器の材質としては、レーザー照射により所望のマイクロウェルを設けることができるものであれば、特に制限はなく、例えば、プラスチックやポリスチレン等のポリマー材料が挙げられる。レーザー加工可能なマイクロウェルの寸法としては、開口部直径が200～2000 μm 程度、深さ（開口部から底面までの長さ）が100～900 μm 程度であるが、本発明のPSCコンディショニング法においては、PSC塊全体に未分化性を維持した状態で球状の細胞塊とする必要があることから、6～48時間浮遊培養したときの球状PSC塊の直径が10～800 μm 、好ましくは20～500 μm 、より好ましくは40～100 μm となるような開口部直径と深さとを有することが望ましく、例えば、開口部の平均直径として200～2000 μm 、好ましく200～1000 μm 、より好ましくは200～500 μm 、さらに好ましくは400～500 μm 、深さの平均として100～900 μm 、好ましくは100～400 μm 、より好ましくは100～200 μm を挙げることができる。

[0034] 微細加工培養容器の培養面は、PSCが該培養面に接着しないように、非接着

性もしくは低接着性である。このような培養面は、細胞接着抑制剤（タンパク質低接着剤）を用いた表面処理を施すことにより形成させることができる。細胞接着抑制剤としては、例えば、リン脂質ポリマー（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンなど）、ポリヒドロキシエチルメタアクリレート、フッ素含有化合物、あるいは、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。コート層で細胞接着の抑制を発揮する以外にも、例えばシリコーン樹脂など、細胞接着抑制効果のある樹脂で培養容器を成型してもよい。

[0035] 培養面が非接着性もしくは低接着性であることと、マイクロウェルが漏斗状の斜面となっている内壁面と、該内壁面に滑らかに接続された凹状の曲面となっている底面とを有することにより、単一細胞化して播種されたPSCは、各マイクロウェルに均等に落ち込み、底面に接着することなく、近接する細胞同士が結合して短時間でサイズ均一な球状細胞塊を形成することができる。

なお、互いに隣り合った凹部同士の間には平坦面が存在しないように、互いに隣り合った凹部のそれぞれの内壁面が互いに滑らかに連続するように接続されていることが好ましい。これにより、播種された大半の細胞はウェル内に落ち込み、細胞をロスすることなく球状細胞塊を形成することができる。

[0036] 該微細加工培養容器は、例えば、WO 2017/047735に記載の方法により製造することができる。また、このような微細加工培養容器として、市販のもの（例、AGCテクノグラス社製のEZSPHERE（登録商標）、StemCellTechnologies社製のAggreWell™、クラレ社製のElplasia（登録商標）等）を使用することもできる。

[0037] (c) 工程 (1)

本発明のPSCコンディショニング法の工程 (1) において、上記 (a) のようにして準備したPSCを、上記 (b) の微細加工培養容器に播種し、PSCを短期間浮遊培養することにより、各凹部（マイクロウェル）内に球状細胞塊を形成させる。

例えば、凍結保存したPSCを解凍、起眠して得た正常なPSCコロニー（コロニーの形態が正常であること、コロニーを形成する細胞同士の境界線が明確であること等を観察して選別する）をピックアップして、適当な酵素解離液（例、アキュターゼ、TrypLE Select、TrypLE Express等）を用いて、単一細胞レベルまで解離した後、ROCK阻害剤（例、Y-27632）を添加した未分化維持培地（例、霊長類ES細胞培地、mTeSR1、StemFit AK02N、StemFit AK03N、Essential 8等）中に懸濁して、微細加工培養容器に播種する。PSCの播種密度は、マイクロウェルあたりの細胞数が100～1000細胞、好ましくは100～400細胞、より好ましくは150～300細胞となるようにすればよい。例えば、96-ウェルプレート型のEZSPHERE（登録商標）を用いる場合、1ウェルあたり約95個のマイクロウェルが設けられているので、例えば、1ウェルあたり約10,000～約100,000細胞、好ましくは約10,000～約40,000細胞、より好ましくは15,000～30,000細胞を播種することができる。

[0038] 工程（1）におけるPSCの培養期間は、PSCが細胞塊全体に未分化性を維持した状態で球状細胞塊を形成するのに必要かつ十分な期間であれば特に制限されないが、3日以上培養した場合には、球状PSC塊のサイズが大きくなり未分化性を維持できなくなるおそれがあるので、3日未満であることが望ましい。好ましくは48時間以内、より好ましくは36時間以内である。PSCを微細加工培養容器に播種すると、速やかに（3-6時間程度）球状細胞塊を形成するので、培養期間の下限としては3時間が挙げられるが、工程（2）での接着培養及びそれに続く分化誘導において、安定に効率よく分化細胞を取得するためには、6時間以上であることが好ましく、12時間以上であることがより好ましい。コンディショニング期間の短縮と、その後の分化誘導効率とを考慮すると、好ましい培養期間の範囲として、例えば6～48時間、より好ましくは12～36時間、特に好ましくは約24時間を挙げることができる。

[0039] 培養期間が48時間以内の場合、得られる球状PSC塊のサイズは、PSCの播種密度や微細加工培養容器の凹部（マイクロウェル）のサイズによって変動する。球状PSC塊が全体に未分化性を維持するためには、細胞塊の直径が10～80

0 μm 、好ましくは20～500 μm 、より好ましくは40～100 μm となるように調整することが望ましい。例えば、微細加工培養容器として開口部直径400～500 μm 、深さ100～200 μm の96-ウェルプレート型のEZSPHERE（登録商標）（本製品では96個の各ウェルあたり約95個の凹部（マイクロウェル）が配置されている）を用いる場合、該マイクロウェルあたりのPSC播種細胞数を100～400個、好ましくは150～300個とすることにより、1～2日の培養により所望のサイズの球状PSC塊を調製することができる。この場合において、ウェル（マイクロウェル）をその内部に配置している、96個の各ウェル）あたりの播種細胞数に換算すると、約10,000～約40,000個、好ましくは約15,000～約30,000個を播種することになる。

[0040] （d）工程（2）

本発明のPSCコンディショニング法の工程（2）においては、工程（1）で得られた球状細胞塊を平面接着培養することにより、該細胞塊を自発的に扁平化させ、略2次元構造の細胞塊に変化させる。

微細加工培養容器からピペッティング等により球状PSC塊を回収し、未分化維持培地（例、霊長類ES細胞培地、mTeSR1、StemFit AK02N、StemFit AK03N、Essential 8等）中に懸濁して、ラミニン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリ-L-オルニチン、及びフィブロネクチン並びにそれらの混合物、例えばマトリゲル、並びに溶解細胞膜調製物（lysed cell membrane preparations）等の細胞接着用基質でコーティングした培養容器上に播種し、37℃、5% CO₂インキュベーター中で培養する。細胞接着用基質としては、PSCの未分化性維持のために、TGF β 等の種々の因子が混在しているマトリゲルや溶解細胞膜調製物等よりも、既知組成の細胞外マトリクス、例えば、ラミニン、フィブロネクチン及びそれらの断片（例えば、ラミニン511 E8断片（例、iMatrix-511））等を用いることが望ましい。播種密度は特に制限はないが、例えば1～10細胞塊/cm²、好ましくは2～5細胞塊/cm²であり得る。

[0041] 工程（2）におけるPSC塊の培養期間は、PSC塊が自発的に扁平化して略2次

元構造をとるようになるのに十分な期間であれば特に制限はないが、例えば2～4日、好ましくは約3日であり得る。

[0042] 工程（2）により得られるPSC塊は、略2次元構造をとるため、スフェロイド構造のEBのように細胞間接着が強固ではなく、酵素処理により容易に単一細胞レベルにまで解離することができる。従って、分化誘導の途中又は分化誘導後に、細胞集団を酵素処理し、目的とする分化細胞もしくはその前駆細胞に特異的な分化マーカーを指標として、該分化細胞もしくは該前駆細胞を選別することにより、目的の細胞以外の混入が少なく純度の高い分化細胞集団を得ることができる。

[0043] （11）多能性幹細胞から所定の分化細胞を作製する方法

本発明はまた、本発明のPSCコンディショニング法により得られた、馴化されたPSCから、高純度に目的とする分化細胞もしくはその前駆細胞を作製する方法（以下、「本発明の分化誘導法」ともいう）を提供する。

即ち、本発明の分化誘導法は、

（1）本発明のPSCコンディショニング法により得られた、馴化されたPSCを、目的とする分化細胞（もしくはその前駆細胞）への分化を誘導する培地中で接着培養する工程；並びに

（2）工程（1）で得られた分化細胞（もしくはその前駆細胞）を含む細胞集団から、該分化細胞（もしくはその前駆細胞）に特有の分化マーカーを指標として、該分化細胞（もしくはその前駆細胞）を選別する工程を含む。

尚、ここで「目的とする分化細胞」とは、最終的に作製しようとする分化細胞を意味し、「その前駆細胞」とは、PSCを目的の分化細胞にまで分化させる間に多段階の分化誘導工程を要する場合に、その分化誘導の途中で経由する細胞を意味する。最終的に作製しようとする分化細胞を得るために、その途中で必然的に誘導されるという意味で、該前駆細胞もまた「目的とする細胞」といえるので、以下、特に断らない限り、該前駆細胞も含めて「目的とする分化細胞」、「所定の分化細胞」と包括的に呼ぶこととする。

[0044] 本発明のPSCコンディショニング法により得られたPSC塊は、例えば、当該方法の工程（2）で用いた培養容器から培地を除去し、目的とする分化細胞への分化を誘導する培地（分化誘導培地）を添加して、そのまま接着培養を続けることにより、本発明の分化誘導法の工程（1）を行うことができる。

[0045] 分化誘導培地の基礎培地としては、例えば、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、最小必須培地（MEM）、Eagle MEM培地、 α MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、及びこれらの混合培地などが挙げられる。Essential 8やEssential 6、Stemline（登録商標）Stemline II等の市販の培地を用いることもできる。

[0046] 培地は、血清含有培地又は無血清培地であり得る。好ましくは、無血清培地が使用され得る。無血清培地（SFM）は任意の血清代替物を含んでよい。

培地は、自体公知のその他の添加物、例えば、成長因子（例えば、インスリンなど）、ポリアミン類（例えば、プトレシンなど）、ミネラル（例えば、セレン酸ナトリウムなど）、糖類（例えば、グルコースなど）、有機酸（例えば、ピルビン酸、乳酸など）、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸（NEAA）、L-グルタミンなど）、還元剤（例えば、2-メルカプトエタノールなど）、ビタミン類（例えば、アスコルビン酸、d-ビオチンなど）、ステロイド（例えば、[ベータ]-エストラジオール、プロゲステロンなど）、抗生物質（例えば、ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシンなど）、緩衝剤（例えば、HEPESなど）、栄養添加物（例えば、B27 supplement、N2 supplement、StemPro（登録商標）-Nutrient Supplementなど）等を含むことができる。各添加物は自体公知の濃度範囲で含まれることが好ましい。

[0047] 分化誘導培地には、目的とする分化細胞への分化を誘導し得る分化誘導因子が含まれる。そのような分化誘導因子は、目的とする分化細胞の種類に応じて、自体公知のものを適宜選択して用いることができる。

[0048] 例えば、目的とする分化細胞として、中胚葉系の細胞を挙げることができ

る。該中胚葉系の細胞は、PSCからの分化誘導系が確立している限り、中胚葉系に属するいかなる細胞であってもよいが、例えば、血液細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞、軟骨細胞、腎細胞、心筋細胞、脂肪細胞、あるいはそれらの前駆細胞などが挙げられる。ここで「血液細胞」とは、造血幹細胞から分化する血液中に含まれる任意の細胞を意味し、赤血球、血小板、好中球、好酸球、好塩基球、マクロファージ、NK細胞、樹状細胞、T細胞、B細胞、並びにそれらの前駆細胞（例、赤芽球、骨髓芽球、単球、リンパ球系前駆細胞など）等が包含される。

[0049] あるいは、目的とする分化細胞として、内胚葉系の細胞を挙げることができる。内胚葉系の細胞は、PSCからの分化誘導系が確立している限り、内胚葉系に属するいかなる細胞であってもよいが、例えば、膵 β 細胞、肝細胞、腸管細胞、肺細胞、甲状腺細胞等の細胞又はそれらの前駆細胞などが挙げられる。

[0050] 中胚葉系及び内胚葉系は、中内胚葉細胞を共通の前駆体とする。従って、中胚葉系又は内胚葉系の細胞への分化誘導工程の初期において、中内胚葉細胞への分化が誘導される。中内胚葉細胞への分化は、例えば、T、Foxa2、Gsc、Mixl1等の中内胚葉マーカーの発現を調べることにより確認することができる。

[0051] あるいは、目的とする分化細胞として、外胚葉系の細胞を挙げることができる。外胚葉系の細胞は、PSCからの分化誘導系が確立している限り、外胚葉系に属するいかなる細胞であってもよいが、例えば、神経系細胞（例、神経細胞、グリア細胞等）、感覚系細胞もしくは表皮系細胞（例、皮膚細胞）又はそれらの前駆細胞などが挙げられる。

[0052] PSCから上記のいずれかの中胚葉系細胞、内胚葉系細胞又は外胚葉系細胞への分化誘導法は、それぞれ当該技術分野において周知であり、例えば、中辻及び末盛編、「実験医学別冊 ES・iPS細胞実験スタンダード」（羊土社発行、2014年）に種々の三胚葉系細胞への分化誘導法が記載されており、当業者であれば、これらの成書を参照することにより、PSCを各種三胚葉系細胞へと

分化誘導することができる。

- [0053] 本発明の好ましい一実施態様において、目的とする分化細胞は造血性内皮細胞（HE）である。HEへの分化誘導は、例えば、（i）本発明のPSCコンディショニング法により得られたPSC塊を、BMP、GSK3 β 阻害剤およびVEGFを含む培地中で接着培養し、次いで（ii）VEGF、SCFおよびTGF β 阻害剤を含む培地中で接着培養することにより実施することができる。
- [0054] 上記工程（i）に用いるBMPは、BMP2、BMP4及びBMP7からなる群より選択される少なくとも一つのBMPであり、好ましくは、BMP4である。BMPはヒト由来のものが好ましい。例えば、BMP4を用いる場合、BMP4の濃度は、特に限定されないが、5 ng/mlから200 ng/ml、10 ng/mlから100 ng/ml、20ng/mlから80 ng/mlが例示される。
- [0055] GSK3 β 阻害剤としては、例えば、インジルピン誘導体であるBIO（別名、GSK-3 β 阻害剤IX；6-ブロモインジルピン3'-オキシム）、マレイミド誘導体であるSB216763（3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン）、フェニル α ブromoメチルケトン化合物であるGSK-3 β 阻害剤VII（4-ジブromoアセトフェノン）、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts及び高い選択性を有するCHIR99021（6-[2-[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)pyrimidin-2-ylamino]ethylamino]pyridine-3-carbonitrile）が挙げられる。これらの化合物は、例えばCalbiochem社やBiomol社等から市販されており、容易に利用することが可能である。好ましくは、CHIR99021であり得る。例えばCHIR99021を用いる場合、CHIR99021の濃度は、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mまたはこれらの間の濃度であるが、これらに限定されない。
- [0056] VEGFにはいくつかのスパイスバリエント（ヒトでは、主に121、165、189、201アミノ酸長）があり、それらのいずれを用いてもよいし、複数を組み合わせ用いてもよいが、他のサブタイプより強いシグナルを伝達することか

ら、VEGF 165が好ましく用いられ得る。VEGFの濃度は、特に限定されないが、5 ng/mlから200 ng/ml、10ng/mlから100 ng/ml、または20 ng/mlから80 ng/mlが例示される。VEGFはヒト由来のものが好ましい。

[0057] 工程 (i) の培養は、37℃、5% CO₂インキュベーター中（好ましくは、5% O₂の低酸素条件下）で2～3日間行うことができる。

[0058] 上記工程 (i i) に用いられるVEGFの濃度としては、工程 (i) と同様の濃度が挙げられる。SCFの濃度としては、5 ng/mlから200 ng/ml、10 ng/mlから100 ng/ml、または20 ng/mlから80 ng/mlが例示される。SCFはヒト由来のものが好ましい。

[0059] TGFβ阻害剤としては、例えば、SB431542、SB202190 (R.K.Lindemann et al., *Mol. Cancer* 2:20 (2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01 (WO 2009/146408) などが挙げられる。これらの化合物は、例えばSTEMGENT社等から市販されており、容易に利用することが可能である。好ましくは、SB431542であり得る。例えばSB431542を用いる場合、SB431542の濃度は、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μMまたはこれらの間の濃度であるが、これらに限定されない。

[0060] 上記工程 (i i) で用いる培地には、さらにbFGFを添加することができる。bFGFの濃度は、特に限定されないが、5 ng/mlから200 ng/ml、10 ng/mlから100 ng/ml、または20 ng/mlから80 ng/mlが例示される。bFGFはヒト由来のものが好ましい。

[0061] 工程 (i i) の培養は、37℃、5% CO₂インキュベーター中（好ましくは、5% O₂の低酸素条件下）で2～3日間行うことができる。

[0062] PSCからHEへの分化誘導は、特開2017-23019号公報、WO 2017/164257、*Nature*, 545: 432-438 (2017)、*Nat. Cell Biol.*, 17(5): 580-591 (2015) に記載の方法に従って行うこともできる。

[0063] 本発明の分化誘導法の工程（２）においては、工程（１）で得られた分化細胞を含む細胞集団から、該分化細胞に特有の分化マーカーを指標として該分化細胞を選別する。分化マーカーとしては、目的とする分化細胞に応じて自体公知のものを用いることができる。例えば、HEの場合は、CD34陽性を指標として選別することができる。

[0064] 細胞集団から目的とする分化細胞を選別する手段としては、例えば、FACS又はMACSを用いることができるが、細胞へのダメージが少ない等の観点から、MACSを用いることがより好ましい。

[0065] 本発明の分化誘導法により選別された高純度の分化細胞が、最終的な目的の細胞の前駆細胞である場合、該選別された分化細胞を、さらに自体公知の分化誘導法に供することにより、最終的な目的の分化細胞を大量かつ安定に得ることができる。例えば、上記のようにして、本発明の分化誘導法によりHEを誘導した場合、該選別された高純度のHEを、さらにHPC誘導法に供することにより、大量のHPCを安定に作製することができる。

即ち、本発明はまた、

（１）本発明の分化誘導法により得られた、選別されたHEを提供する工程；
並びに

（２）該HEをHPCに分化誘導する工程
を含む、HPCの作製方法を提供する。

[0066] HEからHPCを分化誘導する方法としては、例えば、WO 2017/164257、Nature, 545: 432-438 (2017)、Nat. Cell Biol., 17(5): 580-591 (2015)に記載の方法等が挙げられるが、それらに限定されず、任意の自体公知の方法が適用可能である。

[0067] 例えば、選別されたHEを、例えば、ラミニン、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリ-L-オルニチン、及びフィブロネクチン並びにそれらの混合物、例えばマトリゲル、並びに溶解細胞膜調製物（lysed cell membrane preparations）等の細胞接着用基質でコーティングした培養容器上に播種し、例えば、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、

NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、最小必須培地 (MEM)、Eagle MEM培地、 α MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、あるいは、Essential 8やEssential 6、Stemline(登録商標) Stemline II、StemPro (登録商標) -34等の市販の培地、並びにこれらの混合培地に、例えばSCF、TP0、Flt-3リガンド、IL-6/IL-6R α 等の造血性サイトカインカクテルを添加して、培養することにより、HEをHPCに分化誘導することができる。あるいは、VEGF及びSCFの存在下で1〜3日間培養した後、前記造血性サイトカインカクテルを添加して、培養することもできる。

[0068] 本発明のHPCの作製方法において、工程(2)の培養は、37°C、5% CO₂インキュベーター中(好ましくは、5% O₂の低酸素条件下)で5〜10日間行うことができる。本工程により得られたHPCは、例えば、CD34陽性及びCD45陽性を指標として、FACS又はMACS等により確認・選別することができ、自体公知のコロニー形成アッセイにて機能的なHPCが得られていることを確認することができる。

[0069] 上記のようにして得られるHPCは、自体公知の方法により各種血液細胞にさらに分化(成熟)させることができる。例えば、HEからHPCへの分化誘導において例示された基礎培地に、例えば、SCF、TP0、Flt-3リガンド、IL-6/IL-6R α 、IL-3、IL-11、IGF-1、EP0、VEGF、bFGF、BMP4、SHH、アンジオテンシンII等の因子を、目的とする血液細胞に応じて適宜組み合わせ添加し、HPCを培養することにより、目的の血液細胞に分化させることができる。当該培養は、37°C、5% CO₂インキュベーター中(好ましくは、5% O₂の低酸素条件下)で5〜20日間程度行うことができるが、それに限定されない。例えば、巨核球前駆細胞、さらに血小板への分化誘導法については、WO 2018/038242に詳述されている。

[0070] 上記のようにして得られる種々の血液細胞は、各血液細胞に特異的な細胞表面分子の有無(例えば、単球・マクロファージの場合、CX3CR1陽性及びCD1

4陽性；赤芽球系細胞の場合、CD33陰性及びCD235a陽性；骨髓球系細胞の場合、CD33陽性及びCD235a陰性；NK細胞の場合、CD314陽性及びCD56陽性等）を指標として、FACS又はMACS等により確認・選別することができる。

[0071] 後述の実施例2に示されるとおり、本発明の分化誘導法において、HE及びHPCを経由して種々の血液細胞を分化誘導する場合、HEを選別することなくHEを含む細胞集団をHPCへの分化誘導に供し、得られたHPCを、例えばCD34陽性及びCD45陽性を指標として、FACS又はMACS等により確認・選別した後、種々の血液細胞へと分化誘導してもよいし、あるいは、得られたHPCを選別することなくHPCを含む細胞集団を種々の血液細胞への分化誘導に供してもよい。本発明のPSCコンディショニング法により馴化したPSCを用いれば、該PSCから誘導されたHEを選別せずとも、比較的効率よくHPCや種々の血液細胞に分化誘導することができる。

従って、本発明の別の好ましい一実施態様において、本発明の分化誘導法は、最終的な目的とする分化細胞が血液細胞であり、HE及びHPCを経由して該血液細胞への分化を誘導する方法であって、HPC又は目的とする血液細胞に特有の分化マーカーを指標として、当該細胞を選別する工程を含むものである。

[0072] 以下に、実施例によって本発明を更に説明するが、本発明は以下の実施例になんら限定されるものではない。

実施例

[0073] 実施例 1

1. 材料

1-1. 細胞株

409B2、201B7（317-9）（いずれも健常人由来iPS細胞株）

[0074] 1-2. 試薬

各試薬は、以下のように調製した。

PSCプレート培地：使用前に、mTeSR1と10 μ M Y-27632とを混合し、4℃で保存した。スフェロイドプレート培地：mTeSR1と625 - 1,250 ng/mL のiMatrix

-511（細胞株による）とを混合した。0日目の分化培地：Essential 8と2 μ M CHIR99021、80 ng/mL BMP4及び80 ng/mL VEGF 165とを混合した。2日目の分化培地：Essential 6と1 μ M SB431542、80 ng/mL VEGF 165、及び100 ng/mL SCFとを混合した。1 mM EDTA：1 mLの0.5 M EDTAを500 mLのPBS（カルシウム/マグネシウム不含有）に加えた。EHT 培地：Stemline（登録商標）Stem line IIと、50 ng / mL SCF、20 ng / mLのTP0、50 ng / mLのFlt-3L、20 ng / mLのIL-6 / IL-6R α 、ITS-X、Glutamax及び抗生物質-抗真菌薬とを混合した。FACS バッファー：PBS（カルシウム/マグネシウム不含有）と、2% FCS および1 mM EDTAとを混合した。

[0075] 2. PSCコロニー形成

5%CO₂の37°Cインキュベーターで、hPSCを70%から80%の密度になるまで、mTeSR1中の0.5 μ g/cm²のiMatrix-511上で増殖させた。

[0076] PSCの解離（4日前）

培地を吸引し、PBS（Ca / Mg不含有）で培養表面を2回洗浄した。次に、TrypLE Expressで細胞を処理し、37°Cで15分間インキュベートした（この間細胞を乾燥させないようにした）。細胞をmTeSR1に懸濁し、懸濁液を適切なサイズのチューブに移し、細胞を200×gで3分間遠心し、上清を吸引し、細胞をPSCプレーティング培地に懸濁した。PSC懸濁液をEZSPHERE上に48,000～70,000 cells / cm²（細胞株に応じて）でプレーティングし、5%CO₂の37°Cインキュベーターで一晩インキュベートした。この際、96ウェルEZSPHEREプレートに、100 μ L/wellの細胞懸濁液を播種した。一般に、96個のウェルに、約20,000 cells/wellの細胞を播種すると、約100個のスフェロイドが得られる。

[0077] PSCスフェロイドのプレーティング（3日前）

P1000ピペットマンを用いて穏やかにピペッティングすることにより、15mL コニカルチューブにPSCスフェロイドを回収し、スフェロイドを室温で2分間静置することにより沈降させた。上清を吸引し、スフェロイドプレート培地に懸濁し、懸濁液を4-スフェロイド/cm²の密度となるように分注し、5%CO₂の37°Cインキュベーター内で3日間培養した。

[0078] 3. 造血性誘導（中胚葉分化）（0日目）

培地を吸引し、2 μ M CHIR99021、80 ng/mL BMP4及び80 ng/mL VEGF 165を含むEssential 8を加え、5%O₂、5%CO₂の37°Cインキュベーター（低酸素インキュベーター）で培養した。Essential 8中で2日間培養した後、培地を吸引し、次いで1 μ M SB431542、100 ng/mL SCF及び80 ng/mL VEGF 165を含むEssential 6を加え、低酸素インキュベーターで培養した。

[0079] 4. 造血性内皮細胞（hemogenic endothelium）の単離（4日目）

2日後、培地を吸引し、培地の表面をPBS（カルシウム/マグネシウム不含有）で2回洗浄した。TrypLE Expressで細胞を処理し、5%CO₂の37°Cインキュベーター内で30分間インキュベートした。細胞を1 mM EDTAに静かに懸濁し、単一細胞レベルにまで解離させ、懸濁液を50 mLコニカルチューブに移し、細胞を200×gで3分間遠心した。上清を吸引し、300 μ LのMACSバッファーで細胞ペレットを懸濁した。100 μ LのCD34マイクロビーズを添加し、静かにピペティングした後、室温で30分間インキュベートした。懸濁液を40 μ mのセルストレーナーでろ過した。autoMACS Proセパレーターを使用してCD34⁺細胞を分離した。

[0080] 5. 造血性内皮細胞からの造血細胞誘導（Endothelial-to-Hematopoietic Transition : EHT）

5-1. フィブロネクチンコーティング

PBS（カルシウム/マグネシウム不含有）中に1 mg/mLのフィブロネクチンを希釈することで、必要な量の5 μ g/mLのフィブロネクチンコーティング溶液を調製した。24ウェル培養プレートの各ウェルに0.5 mLのコーティング溶液を分注した。プレートを室温で30分間インキュベートした。

[0081] ソートしたCD34⁺細胞を200×gで3分間遠心した。細胞ペレットを1mLのEHT培地中に再懸濁した。次に、細胞数により生細胞密度を決定した。EHT培地を添加することにより細胞密度を200,000細胞/mLに調整した。フィブロネクチンでコーティングしたウェルから、コーティング溶液を吸引して捨てた。各フィブロネクチンでコーティングしたウェルに、0.5 mLのCD34⁺細胞懸濁液を分

注した。低酸素インキュベーターでインキュベートした。

[0082] 6. 造血細胞のフローサイトメトリーアッセイ

6-1. 浮遊細胞の回収

培地を15 mLコニカルチューブに移し、 $200\times g$ で3分間遠心した。上清を吸引した。

[0083] 6-2. 接着細胞の回収

培養表面を0.5 mLのPBS (Ca/Mg不含有) で2回洗浄した。TrypLE Expressを200 μ L加え、TrypLE Expressで表面全体を覆い、余分な液体を吸引した。プレート^oを37°Cのインキュベーターで5分間インキュベートした。細胞を1 mLのFACSバッファーに再懸濁した。

[0084] 浮遊細胞と接着細胞とを混合し、細胞を $200\times g$ で3分間遠心した後、上清を吸引した。次いで、50 μ LのFACSバッファーに再懸濁し、暗所、室温で1時間抗CD34抗体及び抗CD45抗体と細胞とを反応させた。細胞をPBS (Ca/Mg不含有) で2回洗浄し、 $200\times g$ で3分間遠心分離した。上清を吸引し、0.5 μ g/mLのDAPIを含む0.5 mLのFACSバッファーに再懸濁した。LSR FortessaでCD34とCD45の発現を測定した。

[0085] 7. 造血細胞のコロニー形成単位 (CFU) アッセイ

7-1. 造血細胞の回収

培地を15 mLコニカルチューブに移し、ウェルをPBS (Ca/Mg不含有) で2回穏やかに洗浄した。

[0086] 細胞を $200\times g$ で3分間遠心し、上清を吸引した。1 mLのEHT培地に再懸濁し、細胞数を用いて細胞数を決定した。抗生物質を添加した3 mLのMethoCult H4435に、10,000個の細胞に相当する懸濁液を加え、16 Gまたは18 Gシリンジで5回よく混ぜた。次に、Methocult懸濁液全体を6ウェルプレートの各ウェルに分注し、湿度を保ちながら、5%CO₂、37°Cのインキュベーターで、2週間培養した。コロニーは動きに敏感なため、ディッシュを揺らさないようにした。2週間後、顕微鏡下でコロニーを数えた。

[0087] 結果

PSCコロニーを形成する概略的過程を図2に示す。PSCスフェロイドは、EZSPHERE上で1日間形成された。iMatrix-511の存在下では、これらのスフェロイドは、自発的に平らになり、ほとんど二次元コロニーとなった。

[0088] 造血細胞誘導の概略的過程を図3(A)に示す。PSCコロニーを直径750 μ mまで成長させた後、培地を順次交換し中胚葉オルガノイドを誘導した。4日目まで順次培地交換することで、分化の間PSCのコロニーは、次第にサニーサイドアップ構造となった。4日目に、造血性内皮細胞を中胚葉オルガノイドから磁気選別によって純化し(図3(B))、EHT培地に懸濁後、フィブロネクチン上に播種した。これらの細胞を造血サイトカイン(SCF、TPO、Flt-3L及びIL-6/IL-6R α)で7日間刺激することにより、内皮細胞から造血細胞への形態学的変化が起こり、造血細胞コロニーが観察された(図4(A))。このようにして誘導した造血細胞について、フローサイトメトリーを行なったところ、CD34およびCD45の発現が確認された(図4(B))。また、CFUアッセイにより、CD34⁺CD45⁺造血前駆細胞由来の顆粒球/マクロファージ前駆細胞のコロニー形成が確認された(CFU-M = 13、CFU-G = 12、CFU-GM = 13.5、いずれもCD34⁺CD45⁺細胞10,000個から形成されたコロニー数)(図4(C)及び(D))。

[0089] 実施例2

実施例1の2.及び3.と同様にしてPSCコロニー形成及び造血性誘導(中胚葉分化)を行ったのち、分化4日目時点での細胞回収もCD34陽性細胞の選別も行うことなく分化誘導を継続した。本実施例の培養プロトコルの模式図を図5に示す。分化開始から4日目以降は、目的とする細胞の種類に応じ、以下のように異なるサイトカインの組み合わせを用いて培養を継続した。

・造血前駆細胞の誘導(図6A)：分化開始4日目に培地をVEGF及びSCFを添加したStemline(登録商標)Stemline II培地へ変更して2日間培養した。分化開始6日目以後は、SCF、TPO、Flt-3L、ITS-X及びGlutamaxを添加したStemline(登録商標)Stemline IIに交換して4日間培養し、分化開始10日目に浮遊細胞分画中にCD34⁺CD45⁺造血前駆細胞を得た。

・単球・マクロファージの誘導（図6B）：分化開始4日目に培地をVEGF及びSCFを添加したStemPro（登録商標）-34培地へ変更して2日間培養した。分化開始6日目以後は、SCF、TP0、Flt-3L、IL-3、M-CSFを添加したStemPro（登録商標）-34培地に交換して7-10日間培養した。その後さらにサイトカインをFlt-3L、GM-CSF、M-CSFの3種類に変更して7日間培養継続し、浮遊細胞分画中にCD14⁺CX3CR1⁺単球細胞を得た。

・赤芽球系・骨髓球系細胞の誘導（図6C）：分化開始4日目に培地をVEGF及びSCF、TP0、Flt-3L、IL-3、IL-6、EP0を添加したStemline（登録商標）Stemline II培地へ変更して2日間培養した。分化開始6日目以後は、SCF、TP0、Flt-3L、IL-3、IL-6、EP0を添加したStemline（登録商標）Stemline IIに交換して3日間培養した。分化開始9日目に浮遊細胞を回収し、細胞選別を行わずそのまま新しい培養皿へ移して同組成の培地で培養を7日間継続した後、CD235⁺CD33⁻赤芽球細胞とCD235⁻CD33⁺骨髓球系細胞を得た。

・NK細胞の誘導（図6D）：分化開始4日目に培地をSCFおよびFlt-3Lを添加したStemline（登録商標）Stemline II培地へ変更して8日間培養した。分化開始12日目以後にSCF、Flt-3L、IL-7、IL-15を添加したStemline（登録商標）Stemline II培地に交換して36日間培養した後、CD56⁺CD314⁺NK細胞を得た。

[0090] 結果

造血性誘導（中胚葉分化）後に、CD34陽性細胞（HE）の純化を行わずに、HEを含む中胚葉オルガノイドの細胞集団を、直接HPCに分化誘導し、さらに種々の血液細胞へと分化（成熟）させた。その結果、6日間の造血誘導（分化開始から10日）により、CD34陽性及びCD45陽性のHPCへの分化が効率よく誘導されていることが分かった（図6A）。さらに、前記の各種成熟カクテルで刺激することにより、CX3CR1陽性及びCD14陽性の単球・マクロファージ、CD33陰性及びCD235a陽性の赤芽球系、CD33陽性及びCD235a陰性の骨髓球系、CD314陽性及びCD56陽性のNK細胞への分化が確認された（図6B～D）。

産業上の利用可能性

[0091] 本発明によれば、PSCからHE、HPCをはじめとする任意の分化細胞を、大量

かつ安定に作製することが可能となり、疾患モデルの作製、創薬のための頑強な薬効・毒性評価系の構築、さらには臨床応用に向けてきわめて有用である。

[0092] 本出願は日本で出願された特願2019-086767（出願日：2019年4月26日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

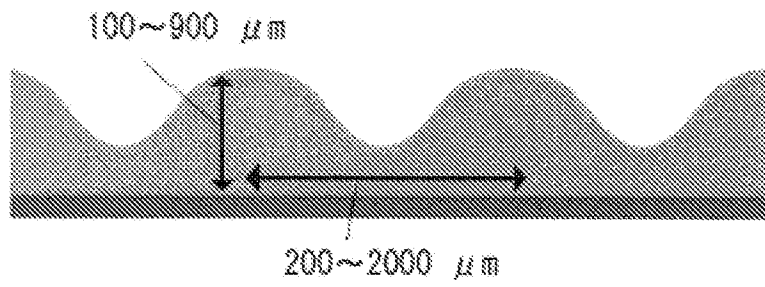
- [請求項1] 分化誘導のために馴化された多能性幹細胞の作製方法であって、
- (1) 非接着性もしくは低接着性の培養面を内部底面として有する培養容器であって、前記培養面には、互いに同一の複数の凹部が互いに隣り合うよう密に配置され、各凹部は、漏斗状の斜面となっている内壁面と、該内壁面に滑らかに接続された凹状の曲面となっている底面とを有する、前記培養容器を用いて、多能性幹細胞を6～48時間浮遊培養し、各凹部内に球状細胞塊を形成させる工程；並びに
- (2) 工程(1)で得られた球状細胞塊を平面接着培養する工程を含む、方法。
- [請求項2] 前記工程(1)に供する多能性幹細胞が、既知組成の細胞外マトリクスでコーティングした培養容器を用いて接着培養されたものである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 細胞外マトリクスがラミニンもしくはその断片である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 多能性幹細胞が胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 多能性幹細胞がヒト由来である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 多能性幹細胞から所定の分化細胞を作製する方法であって、
- (1) 請求項1～5のいずれか一項に記載の方法により得られた、馴化された多能性幹細胞を、該分化細胞への分化を誘導する培地中で接着培養する工程；並びに
- (2) 工程(1)で得られた所定の分化細胞を含む細胞集団から、該分化細胞に特有の分化マーカーを指標として、該分化細胞を選別する工程を含む、方法。
- [請求項7] 前記工程(2)が磁気活性化細胞分離により行われる、請求項6に

記載の方法。

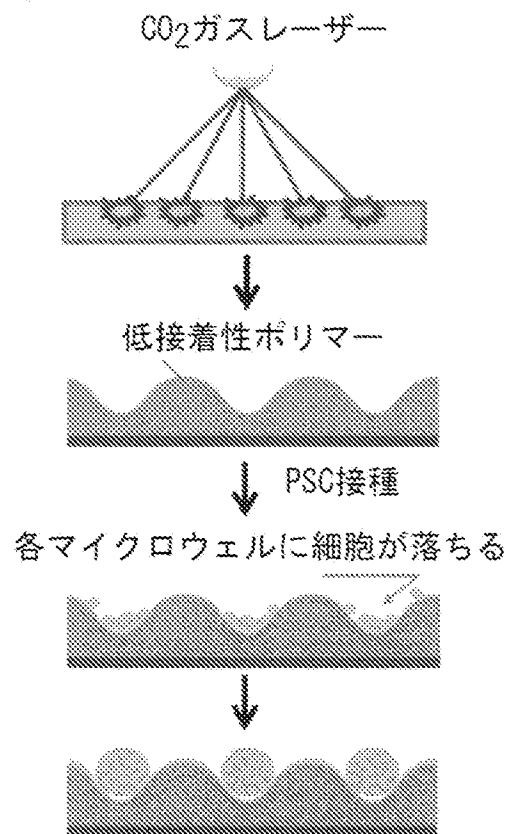
- [請求項8] 所定の分化細胞が中胚葉系の細胞である、請求項6又は7に記載の方法。
- [請求項9] 所定の分化細胞が血液細胞又はその前駆細胞である、請求項8に記載の方法
- [請求項10] 前駆細胞が造血性内皮細胞又は造血前駆細胞である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 造血前駆細胞の作製方法であって、
(1) 請求項10に記載の方法により得られた、選別された造血性内皮細胞を提供する工程；並びに
(2) 該造血性内皮細胞を造血前駆細胞に分化誘導する工程を含む、方法。
- [請求項12] 前記工程(2)が、造血性内皮細胞を、フィブロネクチン、ラミニンもしくはその断片でコーティングした培養容器を用い、Stemline（登録商標）Stemline II培地を基礎培地とする分化誘導培地中で培養することにより行われる、請求項11に記載の方法。

[図1]

A)

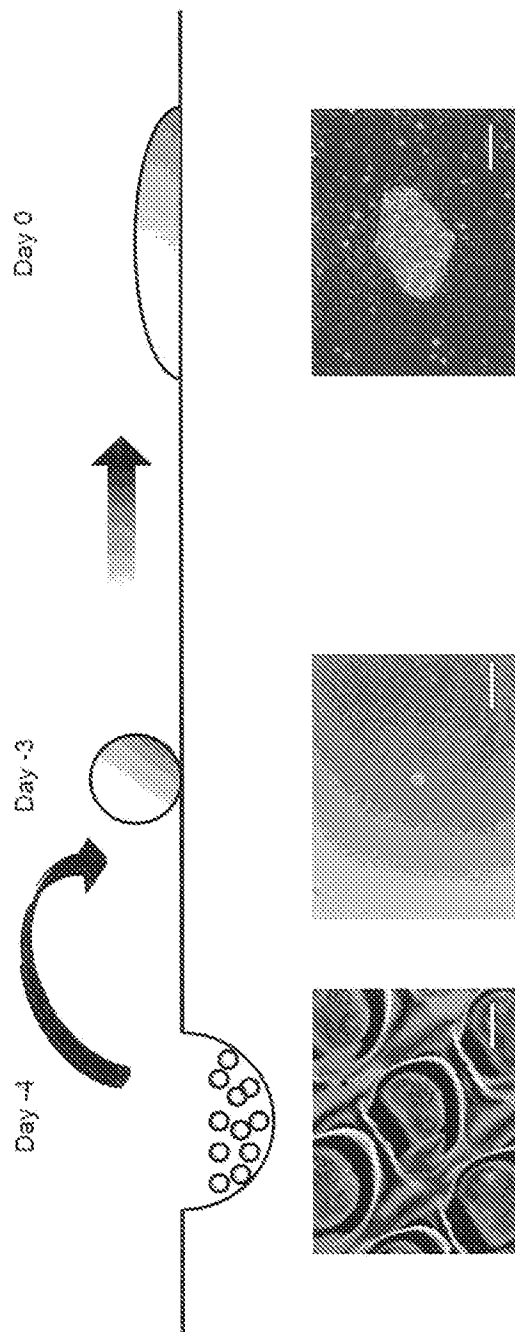


B)



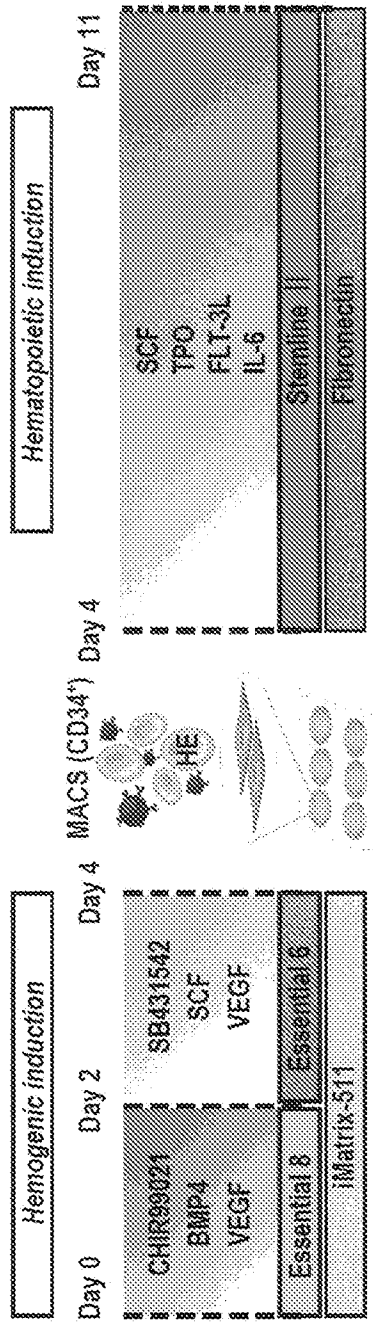
Sci. Rep., 6: 31063 (2016)の Supplementary Fig. 2 から一部改変して転載

[図2]

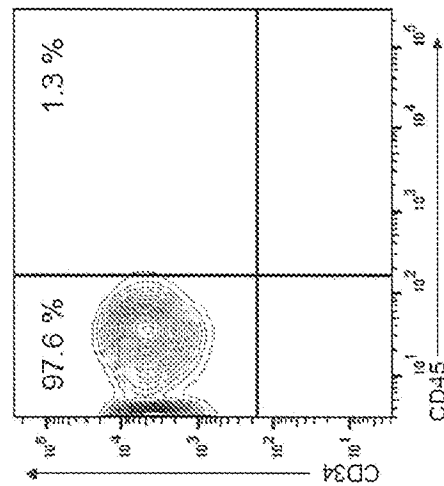


[図3]

A)

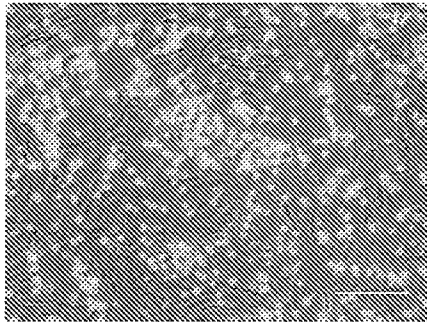


B)

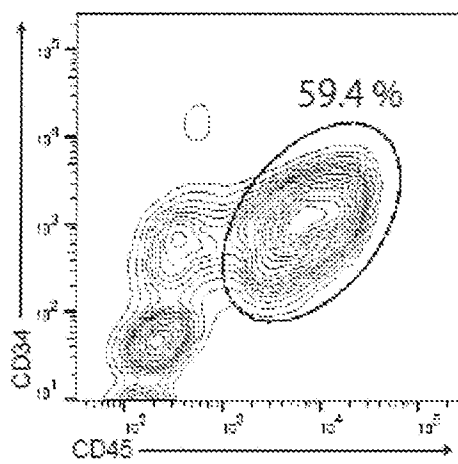


[図4]

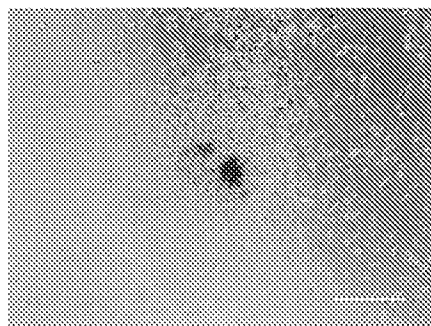
(A)



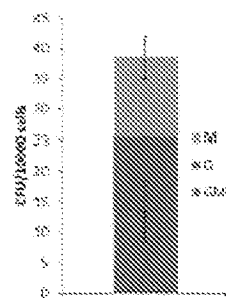
(B)



(C)

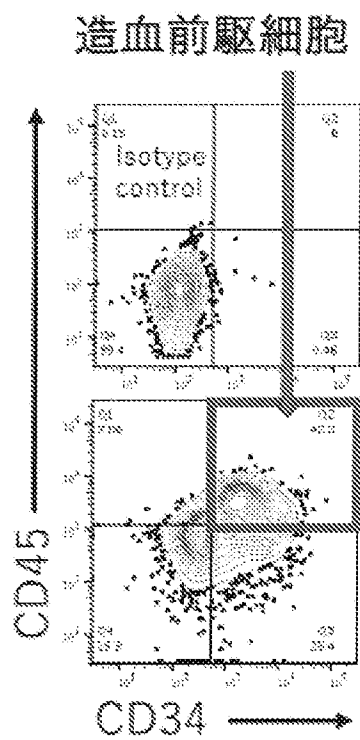


(D)

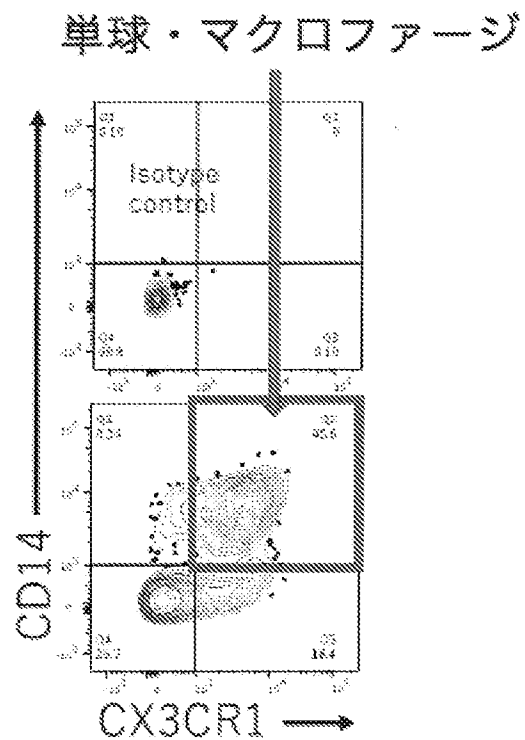


[図6]

(A)

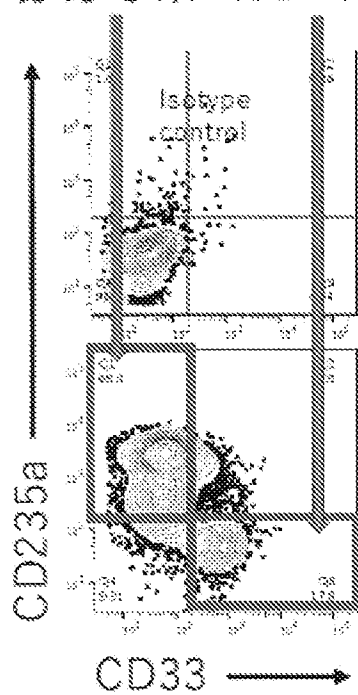


(B)



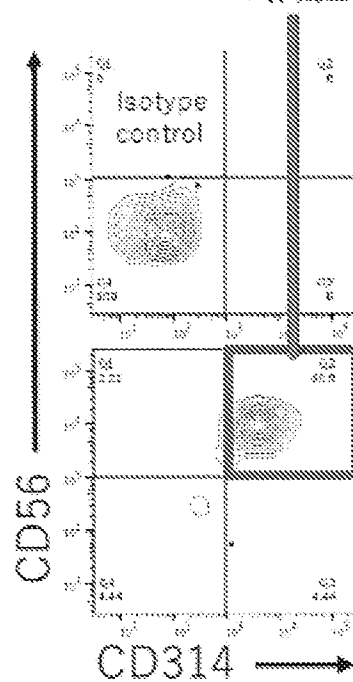
(C)

赤芽球系 骨髓球系



(D)

NK細胞



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/017839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0735 (2010.01) i; C12N 5/0789 (2010.01) i
FI: C12N5/0735; C12N5/0789

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)

C12N5/0735; C12N5/0789

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/115799 A1 (TOKYO ELECTRON LTD.) 31.07.2014 (2014-07-31) claims 1, 11, paragraphs [0022], [0056], examples	1-2, 4-5
Y	claims 1, 11, paragraphs [0022], [0056], examples	1-12
Y	WO 2018/203499 A1 (I PEACE, INC.) 08.11.2018 (2018-11-08) paragraph [0062]	1-12
Y	JP 2016-073323 A (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 12.05.2016 (2016-05-12) paragraphs [0063]-[0065]	1-12
Y	WO 2015/122478 A1 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 20.08.2015 (2015-08-20) paragraphs [0144]-[0149]	1-12



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

"I" 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

08 July 2020 (08.07.2020)

Date of mailing of the international search report

21 July 2020 (21.07.2020)

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/JP2020/017839

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATSUBARA, H. et al., "Induction of human pluripotent stem cell-derived natural killer cells for immunotherapy under chemically defined conditions", Biochem. Biophys. Res. Commun., 2019, vol. 515, pp. 1-8, Available online 02 April 2019, page 2, left column, "2.3. Hematopoietic cell differentiation from hPSCs"	1-12
Y	JP 2017-023019 A (KYOTO UNIVERSITY) 02.02.2017 (2017-02-02) paragraphs [0059]-[0060]	1-12
Y	MURALI, B. et al., "Fibronectin and laminin enhance engraftability of cultured hematopoietic stem cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, vol. 350, pp. 1000-1005, abstract	1-12
P,X	OHTA, R. et al., "Hemogenic endothelium differentiation from human pluripotent stem cells in a feeder- and xeno-free defined condition", J. Vis. Exp., 2019, (148), e59823, abstract, fig. 1	1-12
A	熊谷博道, ほか, 多能性幹細胞胚様体形成用 3 次元培養容器「EZSPHERE」, BIO Clinica, 2016, vol. 31, no. 11, pp. 1201-1204, abstract, fig. 1-2, non-official translation (KUMAGAI, Hiromichi et al., "Three-dimensional culture container 'EZSPHERE' for pluripotent stem cell embryoid body formation")	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/017839

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2014/115799 A1	31 Jul. 2014	US 2015/0353884 A1 claim 29, paragraphs [0027], [0088], [0125], examples	
WO 2018/203499 A1	08 Nov. 2018	EP 3607957 A1 paragraph [0062]	
JP 2016-073323 A	12 May 2016	US 2013/0309768 A1 paragraphs [0083]- [0085]	
WO 2015/122478 A1	20 Aug. 2015	US 2017/0044491 A1 paragraphs [0193]- [0197]	
JP 2017-023019 A	02 Feb. 2017	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i FI: C12N5/0735; C12N5/0789										
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）） C12N5/0735; C12N5/0789										
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 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020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 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020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 - 2020年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)										
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								
X	WO 2014/115799 A1 (東京エレクトロン株式会社) 31.07.2014 (2014 - 07 - 31) 請求項1, 請求項11, 段落[0022], [0056], 実施例	1-2, 4-5								
Y	請求項1, 請求項11, 段落[0022], [0056], 実施例	1-12								
Y	WO 2018/203499 A1 (アイ ピース, インコーポレイテッド) 08.11.2018 (2018 - 11 - 08) 段落[0062]	1-12								
Y	JP 2016-073323 A (協和発酵バイオ株式会社) 12.05.2016 (2016 - 05 - 12) 段落[0063]-[0065]	1-12								
Y	WO 2015/122478 A1 (日産化学工業株式会社) 20.08.2015 (2015 - 08 - 20) 段落[0144]-[0149]	1-12								
Y	MATSUBARA H. et al., Induction of human pluripotent stem cell-derived natural killer cells for immunotherapy under chemically defined conditions, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2019, Vol. 515, pp.1-8, Available online 2 April 2019 2ページ左欄 "2.3. Hematopoietic cell differentiation from hPSCs"	1-12								
☒ 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、一般的な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の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抵触するものではなく、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 08.07.2020		国際調査報告の発送日 21.07.2020								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 市島 洋介 4N 5804 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								

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	JP 2017-023019 A (国立大学法人京都大学) 02.02.2017 (2017 - 02 - 02) 段落[0059]-[0060]	1-12
Y	MURALI B. et al., Fibronectin and laminin enhance engraftability of cultured hematopoietic stem cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, Vol. 350, pp.1000-1005 要約	1-12
P, X	OHTA R. et al., Hemogenic endothelium differentiation from human pluripotent stem cells in a feeder- and xeno-free defined condition, J. Vis. Exp., 2019, (148), e59823 要約, 図1	1-12
A	熊谷博道, ほか, 多能性幹細胞胚様体形成用 3 次元培養容器 「EZSPHERE」, BIO Clinica, 2016, Vol. 31, No. 11, pp.1201-1204 要約, 図1-2	1-12

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/017839

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2014/115799	A1	31.07.2014	US 2015/0353884 A1 請求項29, 段落[0027], [0088], [0125], 実施例	
WO	2018/203499	A1	08.11.2018	EP 3607957 A1 段落[0062]	
JP	2016-073323	A	12.05.2016	US 2013/0309768 A1 段落[0083]-[0085]	
WO	2015/122478	A1	20.08.2015	US 2017/0044491 A1 段落[0193]-[0197]	
JP	2017-023019	A	02.02.2017	(ファミリーなし)	