



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106459906 B

(45) 授权公告日 2021.10.29

(21) 申请号 201580025674.X

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2015.04.20

C12N 5/071 (2010.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 5/0735 (2010.01)

申请公布号 CN 106459906 A

C12N 5/10 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.02.22

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 2010011352 A2, 2010.01.28

2014-087247 2014.04.21 JP

CN 103230623 A, 2013.08.07

2014-260434 2014.12.24 JP

Li Zong-zhe et al..皮肤源性前体细胞的  
生物学特性与临床应用.《中国组织工程研究与  
临床康复》.2011,第15卷(第32期),第6056-6059  
页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Yang JH et al..Skin-derived stem  
cells in human scar tissues:a novel  
isolation and proliferation technique and  
their differentiation potential to  
neurogenic progenitor cell..《Tissue Eng  
Part C Methods》.2010,第16卷(第4期),第619-  
629页.

2016.11.18

审查员 许慧娜

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/002156 2015.04.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/162908 EN 2015.10.29

(73) 专利权人 花王株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 中桐赖子

权利要求书2页 说明书16页

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

序列表7页 附图11页

公司 11322

代理人 龙淳 伍飏

(54) 发明名称

皮肤源性前体细胞的制造方法

(57) 摘要

B  
CN 106459906

本发明涉及一种皮肤源性前体细胞的制造方法,其中,包括在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人源性多功能干细胞使多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞;一种用于使人源性多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞的分化诱导培养基,其中,包含作为分化诱导促进剂的Wnt信号激动剂;一种用于使人源性多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞的分化诱导促进剂,其中,包含Wnt信号激动剂作为活性成分。

1. 一种皮肤源性前体细胞的制造方法，其中，

包括在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人源性多功能干细胞使多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞，所述Wnt信号是提高 $\beta$ -链蛋白的核定位、发挥作为转录因子的作用的一系列作用，

所述人源性多功能干细胞是诱导性多功能干细胞，

分化诱导培养基的基础培养基是D-MEM/Ham's F12培养基，进一步包含B-27添加剂以及选自表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子中的至少一种营养因子。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中，

所述多功能干细胞是来源于多功能干细胞的神经嵴干细胞。

3. 根据权利要求2所述的方法，其中，

在分化诱导培养基中将来源于多功能干细胞的神经嵴干细胞培养3至5天使细胞分化成皮肤源性前体细胞。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法，其中，

将使用分化诱导培养基分化后的皮肤源性前体细胞传代培养1次以上。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法，其中，

Wnt信号激动剂是CHIR99021。

6. 根据权利要求5所述的方法，其中，

分化诱导培养基中CHIR99021的含量为5 $\mu$ M以下。

7. 一种皮肤源性前体细胞的制造方法，其中，

包括在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人源性神经嵴干细胞使神经嵴干细胞分化成皮肤源性前体细胞，所述Wnt信号是提高 $\beta$ -链蛋白的核定位、发挥作为转录因子的作用的一系列作用，

分化诱导培养基的基础培养基是D-MEM/Ham's F12培养基，进一步包含B-27添加剂以及选自表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子中的至少一种营养因子。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中，

在分化诱导培养基中将神经嵴干细胞培养3至5天使细胞分化成皮肤源性前体细胞。

9. 根据权利要求7或8所述的方法，其中，

将使用分化诱导培养基分化后的皮肤源性前体细胞传代培养1次以上。

10. 根据权利要求7或8所述的方法，其中，

Wnt信号激动剂是CHIR99021。

11. 根据权利要求10所述的方法，其中，

分化诱导培养基中CHIR99021的含量为5 $\mu$ M以下。

12. 一种使用培养基使人源性多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞的方法，其中，

所述培养基包含作为分化诱导促进剂的Wnt信号激动剂，所述Wnt信号是提高 $\beta$ -链蛋白的核定位、发挥作为转录因子的作用的一系列作用，

所述人源性多功能干细胞是诱导性多功能干细胞，

所述培养基的基础培养基是D-MEM/Ham's F12培养基，进一步包含B-27添加剂以及选自表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子中的至少一种营养因子。

13. 根据权利要求12所述的方法，其中，

Wnt信号激动剂是CHIR99021。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,

所述培养基中CHIR99021的含量为5μM以下。

15. Wnt信号激动剂在用于制造使人源性多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞的分化诱导培养基中的用途,

所述Wnt信号是提高β-链蛋白的核定位、发挥作为转录因子的作用的一系列作用,

所述人源性多功能干细胞是诱导性多功能干细胞,

分化诱导培养基的基础培养基是D-MEM/Ham's F12培养基,进一步包含B-27添加剂以及选自表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子中的至少一种营养因子。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中,

Wnt信号激动剂是CHIR99021。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中,

分化诱导培养基中CHIR99021的含量为5μM以下。

18. 一种使用Wnt信号激动剂作为使人源性多功能干细胞分化成皮肤源性前体细胞的分化诱导培养基的方法,

所述Wnt信号是提高β-链蛋白的核定位、发挥作为转录因子的作用的一系列作用,

所述人源性多功能干细胞是诱导性多功能干细胞,

所述分化诱导培养基的基础培养基是D-MEM/Ham's F12培养基,进一步包含B-27添加剂以及选自表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子中的至少一种营养因子。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,

Wnt信号激动剂是CHIR99021。

## 皮肤源性前体细胞的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种皮肤源性前体细胞的制造方法。

### 背景技术

[0002] 再生医学作为能够使由于疾病、事故或其它原因而受损的细胞、组织或器官再生和使它们失去的功能恢复的药物治疗而受到关注。在实施再生医学的临床现场,为了使由于外科治疗、事故等而失去的细胞、组织和器官再生,正在尝试使用人工培育的细胞或组织的各种治疗。另外,从外观(社会方面)、健康方面等出发,毛囊再生技术就提高生活质量(QOL)而言是很重要的。

[0003] 皮肤源性前体细胞(以下也称为“SKPs”)作为用于人工培养细胞和组织的细胞来源之一而为人所知。SKPs存在于真皮乳头中的细胞,并且是能够在神经元、神经胶质细胞(neuroglia cell)、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞、真皮乳头细胞等中进行分化的细胞。由此,SKPs是在维持真皮环境、组织修复、毛囊形成等中发挥重要作用的细胞(参照非专利文献1和2)。

[0004] 因此,在进行再生医疗的临床现场,为了使由于外科治疗、事故或其它原因而失去的细胞、组织和器官再生,寻求开发一种有效地得到大量SKPs的方法。进一步,为了使有助于提高QOL的毛囊再生,也渴望有这样的有效地得到大量SKPs的方法。

[0005] 作为得到SKPs的方法的具体例子,迄今为止报道有作为使人或非人动物细胞集合体漂浮来采集和培养SKPs的方法(例如,参照非专利文献1);和由来自人或非人动物细胞的进行过附着培养的细胞制造SKPs的方法(例如,参照非专利文献3)。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Jean G.Toma,et al.,Nature Cell Biology,vol.3,p.778-784(2001)

[0009] 非专利文献2:J.Biemaskie,et al.,Cell Stem Cell,vol.5,p.610-623(2009)

[0010] 非专利文献3:Rebecca P.Hill,et al.,PLoS One.,vol.7(11),p.e50742(2012)

### 发明内容

[0011] 本发明涉及一种SKPs的制造方法,其中,包括在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人源性多功能干细胞使上述多功能干细胞分化成SKPs。

[0012] 另外,本发明涉及一种用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导培养基,其中,包含作为分化诱导促进剂的Wnt信号激动剂。

[0013] 进一步,本发明涉及一种用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂,其中,包含Wnt信号激动剂作为活性成分。

[0014] 适当参照附图,从以下的说明中更充分地明确本发明的其它和进一步的特征和优点。

## 附图说明

[0015] 图1(A)表示人诱导性多功能干细胞的显微镜照片(以下也称为“iPS细胞”),图1(B)表示人iPS细胞源性神经嵴干细胞的显微镜照片,图1(C)表示在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人iPS细胞源性神经嵴干细胞而得到的SKPs的显微镜照片,图1(D)表示将在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人iPS细胞源性神经嵴干细胞所得到的SKPs传代培养而制造的细胞的显微镜照片。

[0016] 图2表示在不同浓度的Wnt信号激动剂下,通过培养来分化诱导时由人iPS细胞源性神经嵴干细胞分化后的SKPs的显微镜照片。图2(A)表示在没有添加激动剂( $0\mu\text{M}$ )的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(B)表示在以 $0.1\mu\text{M}$ 的浓度添加激动剂的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(C)表示在以 $0.5\mu\text{M}$ 的浓度添加了激动剂的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(D)表示在以 $3\mu\text{M}$ 的浓度添加了激动剂的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(E)表示在以 $5\mu\text{M}$ 的浓度添加了激动剂的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片。在此,将传代培养前的细胞的显微镜照片设定为“P0”,并且将传代培养后的细胞的显微镜照片设定为“P1”。

[0017] 图3(A)表示比较了分化诱导成SKPs前后的人iPS细胞未分化时的基因表达的电泳照片,图3(B)表示比较分化诱导成SKPs之后在SKPs中表达的基因的表达的电泳照片。

[0018] 图4(A)是表示传代培养后的人iPS细胞源性SKPs中巢蛋白的表达的荧光显微镜照片,图4(B)是表示传代培养后的人iPS细胞源性SKPs中纤维连接蛋白的表达的荧光显微镜照片,图4(C)是表示传代培养后的人iPS细胞源性SKPs中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-SMA)的表达的荧光显微镜照片。

[0019] 图5是表示对来自iPS细胞的进行过分化诱导的SKPs进行流式细胞检测分析所得到的结果的一系列图表。图5(A)表示从各个细胞的侧向散射(SSC)和前向散射(FSC)中检测iPS细胞源性SKPs的细胞群并选择要分析的细胞群(活细胞的组)而得到的图表。图5(B)是表示在用抗纤维连接蛋白抗体和抗巢蛋白抗体对图5(A)中选择的细胞群染色时荧光强度与细胞计数间的关系的图表。

[0020] 图6(A)表示对于将由人iPS细胞诱导后的SKPs进一步向脂肪细胞分化诱导2周所制得的细胞进行了油红O染色而得到的脂肪细胞的显微镜照片,图6(B)表示对于将由人iPS细胞诱导后的SKPs进一步向骨细胞分化诱导2周所制得的细胞进行了碱性磷酸酶染色而得到的骨细胞的显微镜照片。

[0021] 图7是表示由人iPS细胞制得的SKPs的毛囊诱导能力的一系列显微镜照片。图7(A)表示用抗毛透明蛋白抗体对仅将表皮细胞球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图7(B)表示用抗毛透明蛋白抗体对将表皮细胞和成纤维细胞混合并进行球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图7(C)表示用抗毛透明蛋白抗体对将表皮细胞和真皮乳头细胞混合并进行球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图7(D)表示用抗毛透明蛋白抗体对将表皮细胞和人iPS细胞源性SKPs混合并进行球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图中箭头表示毛透明蛋白的表达。

[0022] 图8(A)表示将由人iPS细胞诱导后的SKPs进一步向雪旺细胞(Schwann cell)分化

3周所制得的细胞的显微镜照片。图8(B)表示使用抗S100-beta抗体将图8(A)中的细胞染色所制得的细胞的荧光显微镜照片。

[0023] 图9(A)表示冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs的显微镜照片。图9(B)表示将部分图9(A)中所示的SKPs冷冻保存,然后融化并将所得到的细胞培养1天而制得的细胞的显微镜照片。图9(C)表示进一步将图9(B)中所示的细胞繁殖/培养3天所制得的细胞的显微镜照片。

[0024] 图10(A)表示对于冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行油红O染色后的脂肪细胞的显微镜照片。图10(B)表示对于冷冻保存后的人iPS细胞源性SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行油红O染色后的脂肪细胞的显微镜照片。

[0025] 图11(A)表示对于冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行碱性磷酸酶染色后的骨细胞的显微镜照片。图11(B)表示对于将冷冻保存融化后的人iPS细胞源性SKPs培养,然后将得到的SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行碱性磷酸酶染色后的骨细胞的显微镜照片。

## 具体实施方式

[0026] 如上所述,SKPs是能够在神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞、真皮乳头细胞等中进行分化的细胞。因此,SKPs在再生医学和类似的领域中有用。如前所述,非专利文献1和3中所记载的方法可以制造能够在神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞、真皮乳头细胞等中进行分化的SKPs。然而,非专利文献1和3中记载的方法在SKPs制造效率方面仍然不充分。

[0027] 因此,本发明其目的在于提供一种有效地制造能够在神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞、真皮乳头细胞等中进行分化的SKPs的方法。

[0028] 进一步,本发明其目的在于提供一种能够优先用于所述方法中的分化诱导培养基和分化诱导促进剂。

[0029] 鉴于上述问题,本发明者们持续专心研究。其结果,本发明者们发现:SKPs能够通过在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人源性多功能干细胞而有效地制得。本发明是基于该发现而完成的。

[0030] 根据本发明的SKPs的制造方法,可以有效地制造能够在神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、真皮乳头细胞等中进行分化的SKPs。

[0031] 进一步,本发明的分化诱导培养基和分化诱导促进剂可以用于上述方法。

[0032] 根据本发明的SKPs的制造方法,使用含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基培养多功能干细胞。因此,进行多功能干细胞向SKPs的分化诱导。通过在含有Mnt信号的激动剂的分化诱导培养基中培养多功能干细胞来提高多功能干细胞的分化效率,由此可以有效地制造SKPs。

[0033] 以下,通过本发明的优选的实施方式来详细地说明本发明。但是,本发明不限定于此。

[0034] 在此,“皮肤源性前体细胞(SKPs)”是指具有自我更新能力的未分化细胞和具有在神经元、神经胶质细胞(例如,小神经胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、雪旺细胞、卫星细胞)、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞、真皮乳头细胞等中

分化能力的细胞。

[0035] 在此，“多功能干细胞”是指具有能够在形成成人的各种组织中分化的多能性和自我更新能力的未分化细胞。本发明中所用的多功能干细胞是iPS细胞。可以根据通常的方法来制造iPS细胞。或者，也可以使用市售的细胞。

[0036] 用于本发明的iPS细胞可以是通过各种方法所建立的人iPS细胞，例如，在皮肤细胞等体细胞中导入Oct3/4基因、Klf4基因、c-Myc基因和Sox2基因等维持或诱导未分化状态所需的因子所制得的人iPS细胞，用特定的化合物对皮肤细胞等体细胞进行处理所制得的人iPS细胞。

[0037] 对培养多功能干细胞的方法进行说明。

[0038] 在本发明中，使用含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基来培养多功能干细胞。在此，“Wnt信号”是指提高β-链蛋白的核定位、发挥作为转录因子的作用的一系列作用。在此，Wnt信号包括如下的一系列流动，其中，例如起因于细胞间的相互作用的从某种细胞中分泌的被称为Wnt3A的蛋白质进一步作用于不同的细胞，并且细胞内的β-链蛋白发生核定位作为转录因子起作用。该一系列流动引起以上皮细胞间质相互作用为例的器官构筑的第一现象。已知Wnt信号通过活化β-链蛋白通道、PCP通道和Ca<sup>2+</sup>通道这三个通道来控制多种细胞功能，例如细胞的生长或分化、器官形成和早起发育时的亲细胞性。

[0039] 在本发明中，可以使用市售的Wnt信号激动剂。或者，可以使用按照通常的方法制得的Wnt信号激动剂。Wnt信号激动剂的具体例子包括：嘧啶胺化合物(例如，CHIR99021(商品名))、双-吲哚(靛红)化合物(以下也称为“BIO”) (例如，(2'Z,3'E)-6-溴靛红-3'-肟)、BIO的丙酮肟(以下也称为“BIO-丙酮肟”) (例如，(2'Z,3'E)-6-溴靛红-3'-丙酮肟)、噻二唑烷(thiadiazolidine, TDZD)化合物(例如，4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮)、氧化噻二唑烷-3-硫酮化合物(例如，2,4-二苄基-5-氧化噻二唑烷-3-硫酮)、噻吩基α-氯甲基酮化合物(例如，2-氯-1-(4,4-二溴噻吩-2-基)-乙酮)、苯基α-溴甲基酮化合物(例如，α-4-二溴乙酰苯)、含有噻唑的脲化合物(例如，N-(4-甲氧基苄基)-N'--(5-硝基-1,3-噻唑-2-基)脲)、以及GSK-3β肽抑制剂(例如，H-KEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>)。本发明中所用的Wnt信号激动剂优选包含选自CHIR99021、BIO、NSC693868(商品名)、SB216763(商品名)、SB415286(商品名)和TWS119(商品名)中的至少一种，进一步优选为CHIR99021。

[0040] 分化诱导培养基中所含的Wnt信号激动剂的含量可以根据培养条件、所使用的多功能干细胞的种类、所使用的Wnt信号激动剂的种类等在Wnt信号被活化并且不破坏细胞生长的范围内适当设定。例如，在使用CHIR99021作为Wnt信号激动剂时，培养基中的Wnt信号激动剂的浓度优选为0.5μM以上，进一步优选为2μM以上，并且优选为5μM以下，进一步优选为4μM以下。Wnt信号激动剂的浓度范围优选为0.5μM至5μM，进一步优选为2μM至4μM。另外，Wnt信号激动剂的浓度特别优选调节至3μM。

[0041] 用于培养多功能干细胞的分化诱导培养基可以通过在通常用于培养干细胞的培养基中添加规定量的Wnt信号激动剂来进行制备。

[0042] 分化诱导培养基的基础培养基可以从通常用于培养干细胞的培养基中适当选择。具体例子包括：MEM培养基(最低基础培养基)、BME培养基(Eagle基本培养基)、IMDM培养基(伊思考夫改良杜尔贝可培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium))、D-MEM培养基(达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium))、Ham's培养基、

RPMI培养基(Roswell Park Memorial Institute medium)、Fischer's培养基、及其混合培养基。这些中，优选为D-MEM/Ham's F12培养基(以下也简称为“D-MEM/F12”)。

[0043] 本发明所用的分化诱导培养基可以包括含有血清的培养基、无血清培养基或含有血清替代物的培养基。作为本发明中可以使用的血清替代物的具体例子，包括白蛋白、转铁蛋白、脂肪酸、胶原蛋白前体、微量元素(例如，锌、硒)、营养因子(EGF(表皮生长因子))、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)、B-27添加剂、N2添加剂、knockout血清替代物和2-巯基乙醇。本发明中所用的分化诱导培养基优选包括含有B-27添加剂以及选自EGF和bFGF中的至少一种营养因子的培养基，进一步优选为含有B-27添加剂、EGF和bFGF的培养基。

[0044] 进一步，根据需要可以在分化诱导培养基中含有通常用于干细胞的培养基的成分，例如饲养细胞、维生素、缓冲剂、无机盐类、抗生素(例如，青霉素、卡那霉素、链霉素)等。

[0045] 由多功能干细胞向SKPs分化诱导通过在适合培养所使用的多功能干细胞的培养温度下将细胞培养充分向SKPs分化诱导的时间来进行实施。例如，在使用iPS细胞作为多功能干细胞时，优选将细胞培养1至20天。

[0046] 在本发明中，可以直接由多功能干细胞向SKPs中进行分化诱导。或者，可以使多功能干细胞分化成神经嵴干细胞或中胚层(优选为神经嵴干细胞)，可以使分化后的神经嵴干细胞或中胚层(优选为神经嵴干细胞)分化成SKPs。可以通过经由神经嵴干细胞等使多功能干细胞分化成SKPs来进一步有效地制造SKPs。使细胞由神经嵴干细胞分化成SKPs的培养条件可以适当设定。例如，通过在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中优选培养神经嵴干细胞3至5天、进一步优选为4天可以使细胞有效地分化成SKPs。

[0047] 在此，“神经嵴干细胞”是指具有自我更新能力和多能性的多功能干细胞，并且在脊椎动物的起源中从神经管的背侧向体中移动以有助于形成各种组织。另外，可以按照通常的方法来确认由多功能干细胞向神经嵴干细胞的分化诱导和向神经嵴干细胞的分化。

[0048] 在本发明中，优选将使用上述分化诱导培养基分化后的SKPs传代培养1次或2次以上。通过进行传代培养，可以作为具有高纯度的细胞群而得到SKPs。

[0049] 上述多功能干细胞和SKPs的传代培养的方法和次数可以根据细胞的种类、培养方法等从通常的传代培养中适当选择。例如，关于附着培养的细胞，利用酶等将细胞解离之后，通过稀释培养进行继代。关于悬浮培养的细胞，通过稀释培养进行继代。

[0050] 在本发明中，可以通过附着培养或悬浮培养进行继代，优选在附着培养的条件下进行继代。

[0051] 根据本发明的SKPs的制造方法，可以以不需要分离和回收的水平的比例来制造向SKPs分化后的细胞。或者，可以利用通常的方法来分离和回收向SKPs分化后的细胞。作为分离和回收向SKPs分化后的细胞的方法的具体例子，包括使用细胞分类器的方法和使用磁珠的方法。

[0052] 由多功能干细胞或神经嵴干细胞向SKPs的分化诱导可以通过评价用于发挥作为这些细胞的功能的蛋白质或编码该蛋白质的基因(以下也简称为“标记”)的表达的有无、或利用显微镜观察细胞形成等来确认。例如，可以通过使用抗原抗体反应的方法来确认蛋白质的表达。可以通过使用Northern印迹步骤、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)等的方法来确认基因的表达。

[0053] 在通过特定基因的表达的有无来确认向SKPs的分化诱导时，作为标记基因可以使

用Oct-4基因、Nanog基因、Nestin基因、Snail基因、Slug基因、Dermo-1基因、Sox9基因、BMP-4基因、Wnt-5a基因、Versican基因、CD133基因等。

[0054] 上述基因中,在分化前的iPS细胞中表达并且通过向其它细胞分化从而表达降低的基因的具体例子包括:Oct-4基因和Nanog基因。通过确认这些基因的表达量的降低,可以确认iPS细胞向SKPs的分化。进一步,作为报道了在SKPs中表达的因子的具体例子,包括:Nestin基因、Snail基因、Slug基因、Dermo-1基因、Sox9基因、BMP-4基因、Wnt-5a基因和Versican基因。通过确认这些基因的表达也可以确认iPS细胞向SKPs的分化。进一步,作为报道有在神经嵴来源和间叶细胞体系来源的真皮乳头细胞中都表达的因子的具体例子,包括CD133基因。

[0055] 在通过特定的蛋白质的表达的有无来确认向SKPs的分化诱导时,作为标记蛋白质可以使用巢蛋白、 $\alpha$ -SMA、纤维连接蛋白等。这些是报道了在SKPs中的表达的蛋白质,因此,通过进行使用了相对于这些标记蛋白质的抗体的免疫荧光染色可以确认向SKPs的分化诱导。

[0056] 如后述实施例所示,Wnt信号激动剂显示促进多功能干细胞(优选为神经嵴细胞)向SKPs的分化诱导,提高多功能干细胞的分化效率的作用。基于该发现,本发明还提供一种含有Wnt信号激动剂作为用于使多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂的分化诱导培养基。另外,本发明还提供一种含有Wnt信号激动剂作为有效成分的用于使多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂。

[0057] 另外,为了用于使多功能干细胞分化成SKPs的非治疗分化诱导法,可以使用Wnt信号激动剂。在此,“非治疗”是指不包括医疗实践、即不包括通过治疗对人体的处置行为的概念。

[0058] 在上述分化诱导培养基和分化诱导促进剂中的Wnt信号激动剂的含量可以根据其使用形态例如多功能干细胞的培养条件来适当设定。

[0059] 根据本发明的SKPs的制造方法,可以有效地制造SKPs。然后,将利用本发明的SKPs的制造方法所得到的SKPs分化诱导成例如神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞或真皮乳头细胞的目标细胞,由此可以有效地制造这些细胞。

[0060] 可以按照通常的方法适当设定使SKPs分化诱导成目标细胞时的培养方法、培养基的组成、分化诱导方法或传代培养方法。

[0061] 另外,还可以按照通常的方法来确认向目标细胞的分化。例如,在使SKPs分化成脂肪细胞时,可以通过用油红O染色法对细胞内脂质进行染色来确认向脂肪细胞的分化。在使SKPs分化成骨细胞时,可以通过利用碱性磷酸酶染色法对细胞进行染色并确认染色的有无来确认向骨细胞的分化。在使SKPs分化成真皮乳头细胞时,可以通过利用免疫荧光染色法评价例如毛透明蛋白的标记蛋白的表达的有无,从而确认与上皮细胞的相互作用由此可以使上皮细胞中的毛囊样的角质化的能力,更具体地说,作为真皮乳头细胞的机能。在使SKPs分化成神经胶质细胞的一种的雪旺细胞时,可以通过利用抗S100- $\beta$ 抗体对细胞进行免疫荧光染色并确认染色的有无来确认向雪旺细胞的分化。

[0062] 由SKPs进一步分化后的细胞可以按照通常的方法依据各个细胞的种类进行分离和回收。

[0063] 通过本发明得到的例如神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮

肤成纤维细胞和真皮乳头细胞的由SKPs分化后的目标细胞可以优先用于由于外科治疗、受伤等而失去的细胞、组织或器官的再生、毛囊的再生等。

[0064] 关于上述实施方式,本发明还公开了下述的制造细胞的方法、分化诱导培养基、分化诱导促进剂、下述用途和下述方法。

[0065] <1>一种SKPs的制造方法,其中,包括在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养人源性多功能干细胞使多功能干细胞分化成SKPs,其中,人源性多功能干细胞是iPS细胞。

[0066] <2>如上述<1>所述的制造方法,其中,多功能干细胞为iPS细胞。

[0067] <3>如上述<1>或<2>所述的制造方法,其中,多功能干细胞是来源于多功能干细胞的神经嵴干细胞。

[0068] <4>如上述<3>所述的制造方法,其中,在分化诱导培养基中将来源于多功能干细胞的神经嵴干细胞培养3至5天、优选为4天使细胞分化成SKPs。

[0069] <5>如上述<1>~<4>中任一项所述的制造方法,其中,Wnt信号激动剂是选自CHIR99021、BIO、NSC693868、SB216763、SB415286和TWS119中的至少一种,优选为CHIR99021。

[0070] <6>如上述<5>所述的制造方法,其中,分化诱导培养基中CHIR99021的含量优选为0.5μM以上,进一步优选为2μM以上,并且优选为5μM以下,进一步优选为4μM以下;或者,优选为0.5μM至5μM,更优选为2μM至4μM,特别优选为3μM。

[0071] <7>如上述<1>~<6>中任一项所述的制造方法,其中,分化诱导培养基的基础培养基是D-MEM/F12培养基。

[0072] <8>如上述<1>~<7>中任一项所述的制造方法,其中,分化诱导培养基进一步包含B-27添加剂以及选自EGF和bFGF中的至少一种营养因子,优选包含B-27添加剂、EGF和bFGF。

[0073] <9>如上述<1>~<8>中任一项所述的制造方法,其中,在附着培养的条件下进行向SKPs的分化。

[0074] <10>如上述<1>~<9>中任一项所述的制造方法,其中,对使用分化诱导培养基分化后的SKPs进行1次以上的传代培养。

[0075] <11>如上述<1>~<10>中任一项所述的制造方法,其中,通过例如使用细胞分类器的方法、使用磁珠的方法等的通常的方法来将分化成SKPs后的细胞分离和回收。

[0076] <12>一种制造目标细胞的方法,其中,将通过上述<1>~<11>中任一项所述的制造方法制得的SKPs进一步分化成目标细胞。

[0077] <13>如上述<12>所述的方法,其中,目标细胞包括选自神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞和真皮乳头细胞中的任意细胞,优选为选自脂肪细胞、骨细胞、神经胶质细胞和真皮乳头细胞中的任意细胞。

[0078] <14>一种用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导培养基,其中,包含作为分化诱导促进剂的Wnt信号激动剂。

[0079] <15>如上述<14>所述的分化诱导培养基,其中,Wnt信号激动剂是选自CHIR99021、BIO、NSC693868、SB216763、SB415286和TWS119中的至少一种,优选为CHIR99021。

[0080] <16>如上述<14>或<15>所述的分化诱导培养基,其中,分化诱导培养基的基础培养基是D-MEM/F12培养基。

[0081] <17>如上述<14>～<16>中任一项所述的分化诱导培养基,其中,进一步包含B-27添加剂以及选自EGF和bFGF中的至少一种营养因子,优选包含B-27添加剂、EGF和bFGF。

[0082] <18>如上述<14>～<17>中任一项所述的分化诱导培养基,其中,进一步包含抗生素,优选为选自青霉素、卡那霉素和链霉素中的至少一种抗生素,更优选为青霉素和链霉素。

[0083] <19>一种用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂,其中,包含Wnt信号激动剂作为活性成分。

[0084] <20>作为用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂的Wnt信号激动剂的用途。

[0085] <21>Wnt信号激动剂在制造用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂中的用途。

[0086] <22>将Wnt信号激动剂作为用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的分化诱导促进剂使用的方法。

[0087] <23>在使人源性多功能干细胞分化成SKPs的方法中所用的Wnt信号激动剂。

[0088] <24>Wnt信号激动剂用于使人源性多功能干细胞分化成SKPs的非治疗分化诱导方法中的用途。

[0089] <25>使用Wnt信号激动剂使人源性多功能干细胞分化成SKPs的方法。

[0090] <26>如上述<19>～<25>中任一项所述的用途或方法,其中,Wnt信号激动剂是选自CHIR99021、BI0、NSC693868、SB216763、SB415286和TWS119中的至少一种,优选为CHIR99021。

[0091] <27>如上述<19>～<26>中任一项所述的用途或方法,其中,多功能干细胞是iPS细胞。

## [0092] 实施例

[0093] 以下,参照实施例来更详细地说明本发明,但是本发明不限定于此。

### [0094] 试验例1iPS细胞的传代培养

#### [0095] (1) 人iPS细胞

[0096] 作为多功能干细胞,使用人源性iPS细胞(商品名:Clone 201B7,传代数:24,由iPS Academia Japan, Inc. 购得)。使用还原病毒载体在人真皮成纤维细胞中导入4种基因(Oct3/4基因、Sox2基因、Klf4基因、c-Myc基因),由此得到了上述iPS细胞。

#### [0097] (2) 饲养细胞的制造

[0098] 作为用于培养上述iPS细胞的饲养细胞,使用了通过以下的方法制得的SNL76/7细胞(小鼠胚胎成纤维细胞系,由CELL BIOLABS, Inc. 制造)。

[0099] 在含有7质量%的胎牛血清(目录编号:SH30070.03E,由HyClone Laboratories, Inc. 制造)和青霉素/链霉素(目录编号:15140-122,50U、50μg/mL,由Life Technologies Corporation制造)的D-MEM培养基(目录编号:11965-092,由Life Technologies Corporation制造)培养SNL76/7细胞。然后,用Mitomycin-C(商品名,浓度:0.012mg/mL,由Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. 制造)将融合细胞处理2小时,用0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸进行分离。在用0.1%明胶(目录编号:G1890,由Sigma-Aldrich Corporation制造)包覆后的培养皿中,将分离后的细胞播种以成为 $1 \times 10^6$ 细胞/100mm盘。24小时之后,将附着于

培养皿上的细胞用作饲养细胞。

[0100] (3) 人iPS细胞的培养

[0101] 作为人iPS细胞用培养基(hES培养基),制备含有血清替代物(目录编号:10828-028,20质量%,由Life Technologies Corporation制造)、L-谷氨酰胺(目录编号:25030-081,2mM,由Life Technologies Corporation制造)、非必需氨基酸(目录编号:M7145,0.1mM,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、2-巯基乙醇(目录编号:21985-023,0.1mM,由Life Technologies Corporation制造)、青霉素/链霉素(目录编号:15140-122,50U、50 $\mu$ g/mL,由Life Technologies Corporation制造)和bFGF(目录编号:064-04541,4ng/mL,由Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造)的D-MEM/F12培养基(D6421,由Sigma-Aldrich Corporation制造)。使用该培养基在37℃下在5%CO<sub>2</sub>的恒温箱中按照Cell,131,pp.861-872(2007)中所记载的方法培养人iPS细胞。每天进行培养基更换。

[0102] 然后,使用解离酶(目录编号:RCHETP002,由ReproCELL Inc.制造)对80~90%融合iPS细胞进行处理,将iPS细胞集落分离。通过吸量管以适当的尺寸将分离后的细胞集落破碎,将用Mitomycin-C处理过的上述SNL饲养细胞播种于事先安排的培养基中,在37℃下在5%CO<sub>2</sub>的恒温箱中培养iPS细胞。每天进行培养基更换。

[0103] 试验例2由人iPS细胞源性神经嵴干细胞向SKPs的分化的诱导

[0104] (1) 人iPs细胞源性神经嵴干细胞的导入

[0105] 基于Nature protocols,5,pp.688-701(2010) or Cell reports,3,pp.1140-1152(2013)中所记载的方法,将试验例中进行过传代培养的iPS细胞在将noggin(目录编号:6057-NG-100/CF,500ng/mL,由R&DSystems,Inc.制造)和/或SB431542(目录编号:1614,10 $\mu$ M,由TOCRIS Bioscience制造)加入到hES培养基(-)bFGF中所制得的培养基中培养5天至2周,由此对由人iPS细胞向神经嵴干细胞的分化进行诱导。

[0106] (2) 由人iPS细胞源性神经嵴干细胞向SKPs的分化的诱导

[0107] 在含有B-27添加剂(目录编号:17504-044,2质量%,由Life Technologies Corporation制造)、EGF(目录编号:336-EG-200,20ng/mL,由R&D Systems,Inc.制造)、bFGF(目录编号:064-04541,40ng/mL,由Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造)、青霉素/链霉素(目录编号:15140-122,50U、50 $\mu$ g/mL,由Life Technologies Corporation制造)和0 $\mu$ M至5 $\mu$ M的CHIR99021(目录编号:13122,由Cayman Chemical Company制造)的D-MEM/F12培养基(目录编号:10565-018,由Life Technologies Corporation制造)中培养上述iPS细胞源性神经嵴干细胞。培养进行3至5天以对由人iPS细胞源性神经嵴干细胞向SKPs的分化进行诱导,使用培养细胞解离酶(商品名:Accutase,目录编号:561527,由BD Biosciences,Inc.制造)将向SKPs分化后的细胞传代培养,进一步在含有B27添加剂(2质量%)、EGF(20ng/mL)、bFGF(40ng/mL)和青霉素/链霉素(50U,50 $\mu$ g/mL)的D-MEM/F12培养基中进行培养。

[0108] 关于由此得到的SKPs,图1表示显示由分化成SKPs前的人iPS细胞向SKPs分化的样貌的显微镜照片。另外,图1(A)表示人iPS细胞的显微镜照片,图1(B)表示人iPS细胞源性神经嵴干细胞的显微镜照片,图1(C)表示在以3 $\mu$ M的量含有Wnt信号激动剂(CHIR99021)的分化诱导培养基中培养人iPS细胞源性神经嵴干细胞而得到的SKPs的显微镜照片,图1(D)表示将在以3 $\mu$ M的量含有Wnt信号激动剂(CHIR99021)的分化诱导培养基中培养人iPS源性神

经嵴干细胞所得到的SKPs传代培养而制造的细胞的显微镜照片(放大倍率:都为40倍)。

[0109] 如图1(A)所示,人iPS细胞在菌落中生长,核的丰度高并且细胞质小。相反地,如图1(D)所示,传代培养后的人iPS细胞源性SKPs不在菌落中,以单个细胞的状态培养,确认了透明细胞质的存在。因此,确认了通过利用上述方法将分化成SKPs的细胞传代培养由此人iPS细胞源性SKPs发生了增殖。

[0110] 然后,图2表示在不同浓度的Wnt信号激动剂(CHIR99021)下,通过培养来分化诱导时由人iPS细胞源性神经嵴干细胞分化后的SKPs的显微镜照片。图2(A)表示在没有添加CHIR99021(0μM)的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(B)表示在以0.1μM的浓度添加CHIR99021的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(C)表示在以0.5μM的浓度添加了CHIR99021的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(D)表示在以3μM的浓度添加了CHIR99021的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片,图2(E)表示在以5μM的浓度添加了CHIR99021的培养基中进行培养的情况下制得的细胞的显微镜照片。在此,将传代培养前的细胞的显微镜照片设定为“P0”,并且将传代培养后的细胞的显微镜照片设定为“P1”。

[0111] 如图2所示,观察到即使在传代培养之前以0.5μM至5μM的浓度添加了CHIR99021时向SKPs分化后的细胞更多在菌落的边缘区域迁移的样子。

[0112] 另外,在传代培养前的阶段,仍然包含除了诱导成SKPs的细胞以外的细胞。因此,在选择性地进行SKPs的传代培养时,观察到以0.5μM至5μM的浓度添加了CHIR99021时向SKPs分化后的细胞更多量地增殖的样貌。

[0113] 因此,确认了通过在含有Wnt信号激动剂的分化诱导培养基中培养多功能干细胞可以有效地制造大量的SKPs。

[0114] 试验例3人iPS细胞源性SKPs的鉴定(1)

[0115] 关于在试验例2中得到的分化诱导前的iPS细胞(以下也称为“iPS”)、iPS细胞源性神经嵴干细胞(以下也称为“iPS-NC”)、传代培养前的iPS细胞源性SKPs(以下也称为“iPS-SKPs-P0”)以及传代培养后的iPS细胞源性SKPs(以下也称为“iPS-SKPs-P1”),使用以下的表1所示的具有核苷酸序列的引物按照RT-PCR法通过以下的方法对表1所示的基因的表达状态进行分析,鉴定得到的SKPs。

[0116] [表1]

[0117]

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
GAPDH	cggagtcaacggatttggctg (SEQ ID NO: 1)	agcccttcatggtgaa (SEQ ID NO: 2)
Oct-4	cgaaggagaagcgaccagg (SEQ ID NO: 3)	gtgaagtggggctccata (SEQ ID NO: 4)
Nanog	cagaaggcctcagcacctac (SEQ ID NO: 5)	gcctccaagtcaactggcag (SEQ ID NO: 6)
Nestin	cagcgttggaaacagaggttg (SEQ ID NO: 7)	gctggcacagggtctcaag (SEQ ID NO: 8)
Snail	accgcctcgctccaatgct (SEQ ID NO: 9)	gtgcatttgagggcaccca (SEQ ID NO: 10)
Slug	catcttggggcagtgagtc (SEQ ID NO: 11)	cccggtgagtttaatgtgtc (SEQ ID NO: 12)
Dermo-1	gcaagaagtgcgaggcaggatg (SEQ ID NO: 13)	ggcaatggcagcatcattcag (SEQ ID NO: 14)
Sox9	gtcagccagggtctcaaagg (SEQ ID NO: 15)	acttgtaatccgggtggcc (SEQ ID NO: 16)
BMP-4	ttctgcagatgttggctgc (SEQ ID NO: 17)	agagccgaagctctgcagag (SEQ ID NO: 18)
Wnt-5a	ggatggctgaaagtgcattg (SEQ ID NO: 19)	acacaaactggcacgcac (SEQ ID NO: 20)
Versican	acgatgcctactttgccacc (SEQ ID NO: 21)	tagtgaaacacaacccatcc (SEQ ID NO: 22)
CD133	atggccctcgactcggctc (SEQ ID NO: 23)	Cacgcggctgtaccacatag (SEQ ID NO: 24)

[0118] 使用RNeasy Mini kit(目录编号:74104,由QIAGEN N.V.制造)从各样品中提取RNA。测定各提取的总RNA的浓度,使用规定量的总RNA和High capacity RNA-to-cDNA Kit(目录编号:4387406,由Applied Biosystems, Inc.制造)进行反转录反应。作为对照,使用人胎脑总RNA(目录编号:636526,由Clontech Laboratories, Inc.制造)进行同样的操作。

[0119] 作为模板,使用1μL的由此得到的cDNA样品,使用上述引物在50μL的体系中进行PCR。这里所使用的酶是KOD-Plus-Ver.2(目录编号:KOD-211,由TOYOB0 Co.,Ltd.制造),在施以94℃、2分钟作为一次循环并且实施25~35次(98℃、10秒;63℃、30秒;68℃、30秒)的反应协议下进行PCR。另外,作为PCR的阳性对照使用人胎脑源性RNA(目录编号:636526,由Clontech Laboratories, Inc.制造)作为模板,以同样的方式进行PCR。

[0120] 然后,使用1.5%琼脂糖凝胶(目录编号:50071,由Takara Bio Inc.制造)/TBE缓冲剂(目录编号:46510-78,由Kanto Chemical Co., Inc.制造)以100V对5μL反应混合物进行电泳。使用GAPDH作为试验整体的对照。

[0121] 图3(A)和(B)表示电泳的结果。在此,图3(A)表示为了维持人iPS细胞的未分化状态的重要的基因的基因表达变化,图3(B)表示对SKPs特异的基因的表达。

[0122] 如图3(A)所示,随着对SKPs的分化诱导,没有向SKPs分化的未分化的细胞中表达的标记的表达降低。进一步,如图3(B)所示,通过对SKPs的分化诱导,从而检测到对SKPs特异的基因的表达。因此,确认了利用上述方法进行过分化诱导的细胞是SKPs。进一步,在iPS-SKPs-P0和iPS-SKPs-P1间比较对SKPs特异的基因的表达时,关于Snail基因、Slug基因、Dermo-1基因、Sox9基因以及CD133基因,认识到与iPS-SKPs-P0相比iPS-SKPs-P1中的表达更高的倾向(参照图3(B))。在此,如图3(B)所示,在iPS-SKPs-P0和iPS-SKPs-P1间作为内部标准的GAPDH基因的表达一定,这表明通过对向SKPs分化后细胞进行传代培养从而增加

了表达SKPs特定的基因的细胞的比例，并且作为纯度更高的细胞群得到了人iPS细胞源性SKPs。

[0123] 试验例4人iPS细胞源性SKPs的鉴定(2)

[0124] 关于上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs，使用以下的表2所示的抗体进行免疫荧光染色，对巢蛋白、 $\alpha$ -SMA和纤维连接蛋白的表达的状态进行分析，鉴定得到的SKPs。

[0125] [表2]

	目标蛋白质	制造商	详细
[0126]	巢蛋白	Millipore	MAB5326
	$\alpha$ -SMA	Sigma Aldrich	A2547
	纤维连接蛋白	Sigma Aldrich	F3648
二级抗体	Alexa Fluor 488 goat 抗小鼠 IgG (H+L)	Life technologies	A11029
	Alexa Fluor 555 donkey 抗兔 IgG (H+L)	Life technologies	A31572

[0127] 用D-PBS(-)清洗上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs，用4%多聚甲醛将得到的传代培养后的SKPs固定15分钟。用D-PBS(-)清洗固定后的细胞，然后用TritonX-100的PBS溶液(浓度：0.5质量%)处理5分钟，再次用D-PBS(-)清洗得到的细胞，使用10%山羊血清(目录编号：426041，由NICHIREI Corporation制造)在室温下封闭1小时。接着，用上述表2所示的初级抗体(室温下、2小时)和二级抗体(室温下、1小时)对得到的细胞进行处理，用4'，6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI，目录编号：FK045，由DOJINDO Laboratories制造)将核染色，然后，进行包埋。由此，在荧光显微镜下观察对SKPs特异的标记蛋白质(巢蛋白、纤维连接蛋白、 $\alpha$ -SMA)的表达。

[0128] 将结果示于图4中。在此，图4(A)是表示巢蛋白的表达的荧光显微镜照片，图4(B)是表示纤维连接蛋白的表达的荧光显微镜照片，图4(C)是表示 $\alpha$ -SMA的表达的荧光显微镜照片(放大倍率：400倍)。

[0129] 如图4所示，在大致全部细胞中发现有对SKPs特异的标记蛋白质的表达。从这些结果可以确认，在上述试验例2中得到的细胞是SKPs。

[0130] 试验例5人iPS细胞源性SKPs的鉴定(3)

[0131] 对于上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs，进行流式细胞检测分析。将结果示于图5中。

[0132] 用D-PBS(-)清洗上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs，然后培养细胞解离酶(商品名：Accutase，目录编号：561527，由BD Biosciences, Inc.制造)将得到的细胞分离。使用 $1 \times 10^6$ 细胞/100 $\mu$ L的样品缓冲液(商品名：BD Cytofix Buffer，目录编号：554655，由BD Biosciences Inc.制造)在室温下将分离后的细胞固定20分钟。用细胞渗透洗涤液(商品名：BD Phosflow Perm/Wash buffer I，目录编号：557885，由BD Biosciences Inc.制造)清洗固定后的细胞，然后，用相同的缓冲液室温下对得到的细胞处理10分钟。接着，以1:20的比例加入抗巢蛋白抗体(目录编号：561231，由BD Pharmingen, Inc.制造)、抗纤维连接蛋白抗体(目录编号：563100，由BD Pharmingen, Inc.制造)和同型

对照(目录编号:347202、目录编号:557782,由BD Biosciences, Inc.制造),使之在室温下反应30分钟。用细胞渗透洗涤液将得到的细胞清洗二次,用500 $\mu$ L的PBS分散,使用BD FACSVerse(由BD Biosciences, Inc.制造)进行悬浊液的流式细胞检测分析。

[0133] 图5(A)表示从各个细胞的SSC和FSC中检测人iPS细胞源性SKPs的细胞群并选择要分析的细胞群(活细胞的组)而得到的图表。图5(B)表示在用抗纤维连接蛋白抗体和抗巢蛋白抗体对图5(A)中选择的细胞群染色的结果。纵轴表示巢蛋白的表达强度(由荧光染色而得到的荧光强度),横轴表示纤维连接蛋白的表达强度(由荧光染色而得到的荧光强度)。

[0134] 根据图5(B)所示的结果,计算出同时表达巢蛋白和纤维连接蛋白的细胞数与图5(B)中用于流式细胞检测分析的总细胞数(图5(A)的选择区域中的细胞数)的比例。其结果,确认了98.46%的细胞表达巢蛋白和纤维连接蛋白(对巢蛋白和纤维连接蛋白都阳性)。

[0135] 因此,确认了利用上述方法进行过分化诱导的细胞中大致全部细胞是表达巢蛋白和纤维连接蛋白的SKPs。另外,确认了通过对利用上述方法制得的细胞进行传代培养从而获得了作为高纯度的细胞群的SKPs。

[0136] 试验例6由人iPS细胞源性SKPs向脂肪细胞的诱导

[0137] 将上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs以 $3 \times 10^5$ 细胞/35mm盘进行播种。培养24小时之后,在含有3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(目录编号:17018,0.45nM,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、胰岛素(目录编号:I3536,2.07 $\mu$ M,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、地塞米松(目录编号:D4902,100nM,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、兔血清(目录编号:R4505,15%,由Sigma-Aldrich Corporation制造)和青霉素/链霉素(目录编号:15140-122,100U,100 $\mu$ g/mL,由Life Technologies Corporation制造)的MEM培养基(目录编号:42360-032,由Life Technologies Corporation制造)中将得到的细胞培养2周。

[0138] 然后,使用油红O染色试剂盒(目录编号:0843,由Sciencell Research Laboratories制造)按照所附的协议来进行对得到的细胞的油红O染色。将结果示于图6(A)中(放大倍率:200倍)。

[0139] 如图6(A)所示,脂质被染色为红色,从而确认了人iPS细胞源性SKPs已分化成脂肪细胞。因此,确认了上述试验例2中得到的细胞是可以分化成脂肪细胞的SKPs。

[0140] 试验例7由人iPS细胞源性SKPs向骨细胞的分化

[0141] 将上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs以 $3 \times 10^5$ 细胞/35mm盘进行播种。培养24小时之后,在含有地塞米松(目录编号:D4902,100nM,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、 $\beta$ -甘油磷酸盐(目录编号:G9422,10mM,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、L-抗坏血酸-2-磷酸酯(目录编号:A8960,50 $\mu$ M,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、胎牛血清(目录编号:SH30070.03,10质量%,由Hyclone制造)和青霉素/链霉素(目录编号:15140-122,100U,100 $\mu$ g/mL,由Life Technologies Corporation制造)的MEM培养基(目录编号:42360-032,由Life Technologies Corporation制造)中将得到的细胞培养2周。

[0142] 然后,使用蓝色碱性磷酸酶底物试剂盒(目录编号:SK5300,由Vector laboratories制造)按照所附的协议来进行对得到的细胞的碱性磷酸酶染色。将结果示于图6(B)中(放大倍率:200倍)。

[0143] 如图6(B)所示,发现有碱性磷酸酶阳性细胞,从而确认了人iPS细胞源性SKPs已分化成骨细胞。因此,确认了上述试验例2中得到的细胞是可以分化成骨细胞的SKPs。

[0144] 试验例8通过球体培养的人iPS细胞源性SKPs的毛囊诱导能力的研究

[0145] 在EpiLife(商品名,由Life Technologies Corporation制造)中在37℃、5%CO<sub>2</sub>下将市售的正常人表皮细胞(NHEK)(由Life Technologies Corporation制造)传代培养,在真皮乳头增殖培养基(由TOYOB0 Co.,Ltd.制造)中在37℃、5%CO<sub>2</sub>下将市售的正常人真皮乳头细胞(由Cell Applications, Inc.制造)传代培养。另外,在含有5质量%的胎牛血清(目录编号:SH30070.03E,由HyClone Laboratories, Inc.制造)和青霉素/链霉素(目录编号:15140-122,50U,50μg/mL,由Life Technologies Corporation制造)的D-MEM培养基(目录编号11965-092,由Life Technologies Corporation制造)中将市售的正常成人真皮成纤维细胞(由Kurabo Industries Ltd.制造)传代培养。另外,作为SKPs,使用上述试验例2中得到的传代培养后的人iPS细胞源性SKPs(iPS-SKPs-P1)。

[0146] 将各种细胞传代培养之后,将表皮细胞、成纤维细胞、真皮乳头细胞和人iPS细胞源性SKPs混合每个4×10<sup>4</sup>细胞,通过96孔无附着圆底板(由CellSeed Inc.制造)使用AmnioMAX C-100培养基(商品名,由Life Technologies Corporation制造)培养得到的混合。培养7天之后,用冷冻组织包埋剂(商品名:OCT Compound,由Sakura Finetek Co.,Ltd.制造)包埋得到的球状物,制造具有6μm的厚度的冷冻切片。

[0147] 对于由此制得的冷冻切片,用4%多聚甲醛将切片固定15分钟,用D-PBS(-)清洗固定后的切片,使用10%山羊血清(目录编号:426041,由NICHIREI Corporation制造)在室温下封闭1小时。然后,用抗毛透明蛋白抗体(目录编号:sc-80607,由Santa Cruz Biotechnology, Inc.制造)在室温下将得到的切片处理2小时,用D-PBS(-)清洗得到的切片,然后,用二级抗体(Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L),目录编号:A11029,由Life Technologies Corporation制造)在室温下将得到的切片处理1小时。用D-PBS(-)清洗得到的切片,然后,使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,目录编号:FK045,由DOJINDO Laboratories制造)将核染色,然后,进行包埋,由此在荧光显微镜下观察毛透明蛋白的染色性。

[0148] 将结果示于图7中。在此,图7(A)表示用抗毛透明蛋白抗体对仅将表皮细胞球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图7(B)表示用抗毛透明蛋白抗体对将表皮细胞和成纤维细胞混合并进行球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图7(C)表示用抗毛透明蛋白抗体对将表皮细胞和真皮乳头细胞混合并进行球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图7(D)表示用抗毛透明蛋白抗体对将表皮细胞和人iPS细胞源性SKPs混合并进行球体培养所得到的细胞团块免疫荧光染色而得到的荧光显微镜照片。图中箭头表示毛透明蛋白的表达。

[0149] 如图7(A)和(B)所示,在仅培养表皮细胞或将表皮细胞和成纤维细胞混合培养时没有诱导毛透明蛋白的表达。相反地,如图7(C)和(D)所示,确认了在将表皮细胞与真皮乳头细胞或人iPS细胞源性SKPs混合培养时诱导了毛透明蛋白的表达。

[0150] 因此,确认了在上述试验例2中得到的细胞与真皮乳头细胞同样地具有毛囊诱导能力。

[0151] 试验例9由人iPS细胞源性SKPs向神经胶质细胞的诱导

[0152] 使用SKPs培养用培养基(含有2% B-27添加剂(目录编号:17504-044,由Life Technologies Corporation制造)、20ng/mL EGF(目录编号:336-EG-200,由R&D Systems, Inc.制造)、40ng/mL bFGF(目录编号:064-04541,由Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)、50U青霉素和50μg/mL链霉素(目录编号:15140-122,由Life Technologies Corporation制造))的DMEM/F12培养基(目录编号:10565-018,由Life Technologies Corporation制造)),以 $4.8 \times 10^4$ 细胞/35mm盘将上述试验例2中得到的传代培养后的SKPs播种于用稀释至25倍的层粘连蛋白(目录编号:P4707,由Sigma-Aldrich Corporation制造)和0.1mg/mL聚L-赖氨酸(目录编号:L4544,由Sigma-Aldrich Corporation制造)进行了预包覆的培养皿中。培养24小时之后,在含有5μM Forskoline(目录编号:F3917,由Sigma-Aldrich Corporation制造)、50ng/mL Heregulin-1-beta(目录编号:100-03,由PeproTech, Inc.制造)、2%N2添加剂(目录编号:17502-048,由Life Technologies Corporation制造)和1%牛血清(目录编号:SH30070.03E,由HyClone Laboratories, Inc.制造)的DMEM:F12培养基(目录编号:10565-018,由Life Technologies Corporation制造)中将细胞培养2至3周。每2至3天进行一次培养基更换。

[0153] 用D-PBS(-)清洗得到的细胞,用4%多聚甲醛固定15分钟。用D-PBS(-)清洗固定后的细胞,然后,用0.5%TritonX-100的PBS溶液处理5分钟,再次用D-PBS(-)清洗得到的细胞,在室温下使用10%山羊血清(目录编号:426041,由NICHIREI Corporation制造)进行封闭1小时。然后,用初级抗体(抗S100-beta抗体,目录编号:S2532,由Sigma-Aldrich Corporation制造,室温下2小时)和二次抗体(Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+ L),目录编号:A11029,由Life Technologies Corporation制造,室温下1小时)对得到的细胞进行处理。然后,用DAPI(目录编号:FK045,由DOJINDO Laboratories制造)对核进行染色,然后进行包埋,在荧光显微镜下观察对雪旺细胞特异的标记蛋白质(S100-beta)的表达。

[0154] 将结果示于图8中。在此,图8(A)表示将由人iPS细胞诱导后的SKPs进一步向雪旺细胞分化3周所制得的细胞的显微镜照片,图8(B)表示使用抗S100-beta抗体将图8(A)中的细胞染色所制得的细胞的荧光显微镜照片。

[0155] 如图8所示,发现有S100-beta阳性细胞,从而确认了人iPS细胞源性SKPs已分化成雪旺细胞。因此,确认了上述试验例2中得到的细胞是能够分化成例如雪旺细胞的神经胶质细胞的SKPs。

[0156] 如上述试验例3~9中所示,确认了上述试验例2中得到的细胞是SKPs。因此,根据本发明,可以有效地制造大量的能够在神经元、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、骨细胞、皮肤成纤维细胞、真皮乳头细胞等中进行分化的SKPs。

[0157] 试验例10根据本发明得到的人iPS细胞源性SKPs的冷冻保存

[0158] 接着,将上述试验例2中得到的传代培养后的 $1 \times 10^6$ 个细胞的SKPs悬浊于1mL Cell Banker I(目录编号:248085,由LSI Medience Corporation制造)中,在-80°C下冷冻。经过2~3天之后,在液氮中保存冷冻后的细胞。

[0159] 将保存后的细胞融化,在人iPS细胞源性SKPs用的培养基(含有2% B27添加剂(目录编号:17504-044,由Life Technologies Corporation制造)、20ng/mL EGF(目录编号:336-EG-200,由R&D Systems, Inc.制造)、40ng/mL bFGF(目录编号:064-04541,由Wako

Pure Chemical Industries,Ltd.制造)、50U青霉素和50 $\mu$ g/mL链霉素(目录编号:15140-122,由Life Technologies Corporation制造)的DMEM/F12培养基(目录编号:10565-018,由Life Technologies Corporation制造))培养融化后的细胞。

[0160] 图9表示冷冻保存前和SKPs融化后的人iPS细胞源性SKPs的显微镜照片。图9(A)表示冷冻保存前的显微镜照片;图9(B)表示将部分图9(A)中所示的SKPs冷冻保存,然后融化并将所得到的细胞培养1天而制得的细胞的显微镜照片;图9(C)表示进一步将图9(B)中所示的细胞繁殖/培养3天所制得的细胞的显微镜照片。

[0161] 如图9所示,确认了即使将细胞冷冻并融化,人iPS细胞源性SKPs也增殖,可以继续培养。因此,表明本发明中得到的人iPS细胞源性SKPs可以冷冻保存和传代培养。

[0162] 试验例11由冷冻融化后的人iPS细胞源性SKPs向脂肪细胞的诱导

[0163] 分别对于试验例10中得到的图9(A)中所示的冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs和图9(C)中所示的冷冻融化后的人iPS细胞源性SKPs,以与试验例6中同样的方法进行细胞向脂肪细胞分化的诱导。将结果示于图10中。在此,图10(A)表示对于冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行油红0染色后的脂肪细胞的显微镜照片。图10(B)表示对于冷冻保存后的人iPS细胞源性SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行油红0染色后的脂肪细胞的显微镜照片。

[0164] 如图10所示,与冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs同样地,在被冷冻、融化、繁殖后的人iPS细胞源性SKPs中脂质也被染色为红色,从而确认了人iPS细胞源性SKPs已分化成脂肪细胞。

[0165] 因此,表明上述试验例2中得到的细胞即使在将细胞传代、冷冻保存后也保持了向脂肪细胞的分化诱导能力。

[0166] 试验例12由冷冻融化后的人iPS细胞源性SKPs向骨细胞的诱导

[0167] 分别对于试验例10中得到的图9(A)中所示的冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs和图9(C)中所示的冷冻融化后的人iPS细胞源性SKPs,以与试验例7中同样的方法进行细胞向骨细胞的分化的诱导。将结果示于图11中。在此,图11(A)表示对于冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行碱性磷酸酶染色后的骨细胞的显微镜照片。图11(B)表示对于将冷冻保存融化后的人iPS细胞源性SKPs培养,然后将得到的SKPs分化诱导2周后所制得的细胞进行碱性磷酸酶染色后的骨细胞的显微镜照片。

[0168] 如图11所示,与冷冻保存前的人iPS细胞源性SKPs同样地,在被冷冻、融化、繁殖后的人iPS细胞源性SKPs中也发现有碱性磷酸酶阳性细胞,从而确认了人iPS细胞源性SKPs已分化成骨细胞。因此,表明上述试验例2中得到的细胞即使在将细胞传代、冷冻保存后也保持了向骨细胞的分化诱导能力。

[0169] 尽管将本发明与其实施方式一起进行了说明,但是,除非特别指定,本发明并不限于说明的任意详细部分,可以在不违反附加的权利要求所示的发明精神和范围的情况下进行广泛的解释。

[0170] 本申请基于2014年4月21日在日本提出的专利申请号2014-087247和2014年12月24日在日本提出的专利申请号2014-260434主张优先权,在此作为参照完整地引入其内容。

## 序列表

<110> 花王株式会社(KAO CORPORATION)

<120> 皮肤源性前体细胞的制造方法

<130> P14-0862WO00

<150> JP 2014-087247

<151> 2014-04-21

<150> JP 2014-260434

<151> 2014-12-24

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

[0001] <213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 GAPDH 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 1

cggagtcaac ggatttggtc g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 GAPDH 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 2

agccttctcc atggtggtga a

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 Oct-4 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 3

cgaaagagaa agcgaaccag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 Oct-4 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 4

gtgaagttag ggctccata

20

[0002]

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 Nanog 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 5

cagaaggcct cagcacctac

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 Nanog 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 6

gcctccaagt cactggcag

19

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 Nestin 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 7  
cagcggttggaa acagagggttg 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 Nestin 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

[0003]

<400> 8  
gctggcacag gtgtctcaag 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 Snail 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 9  
accgcctcgc tgccaatgct 20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 Snail 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 10

gtgcatcttg agggcaccca

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 Slug 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 11

catctttggg gcgagtgagt cc

22

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

[0004]

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 Slug 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 12

cccggtgtgag ttctaatgtg tc

22

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 Dermo-1 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 13

gcaagaagtc gagcgaagat g

21

&lt;210&gt; 14

<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 Dermo-1 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 14  
ggcaatggca gcatcattca g 21

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 Sox9 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 15  
gtcagccagg tgctcaaagg 20

[0005]

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 Sox9 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 16  
acttgaatc cgggtggtcc 20

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 用于扩增 BMP-4 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 17

ttctgcagat gtttgggctg c

21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 BMP-4 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 18

agagccgaag ctctgcagag

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0006] <223> 用于扩增 Wnt-5a 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 19

ggatggctgg aagtgcattg

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于扩增 Wnt-5a 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

<400> 20

acacaaactg gtccacgatc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 Versican 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 21

acgatgccta ctttgccacc

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 Versican 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 22

tagtgaaaca caacccatc c

21

&lt;210&gt; 23

[0007]

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 CD133 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 23

atggccctcg tactcggctc

20

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用于扩增 CD133 基因的核苷酸序列的寡核苷酸

&lt;400&gt; 24

cacgcggctg taccacatag

20

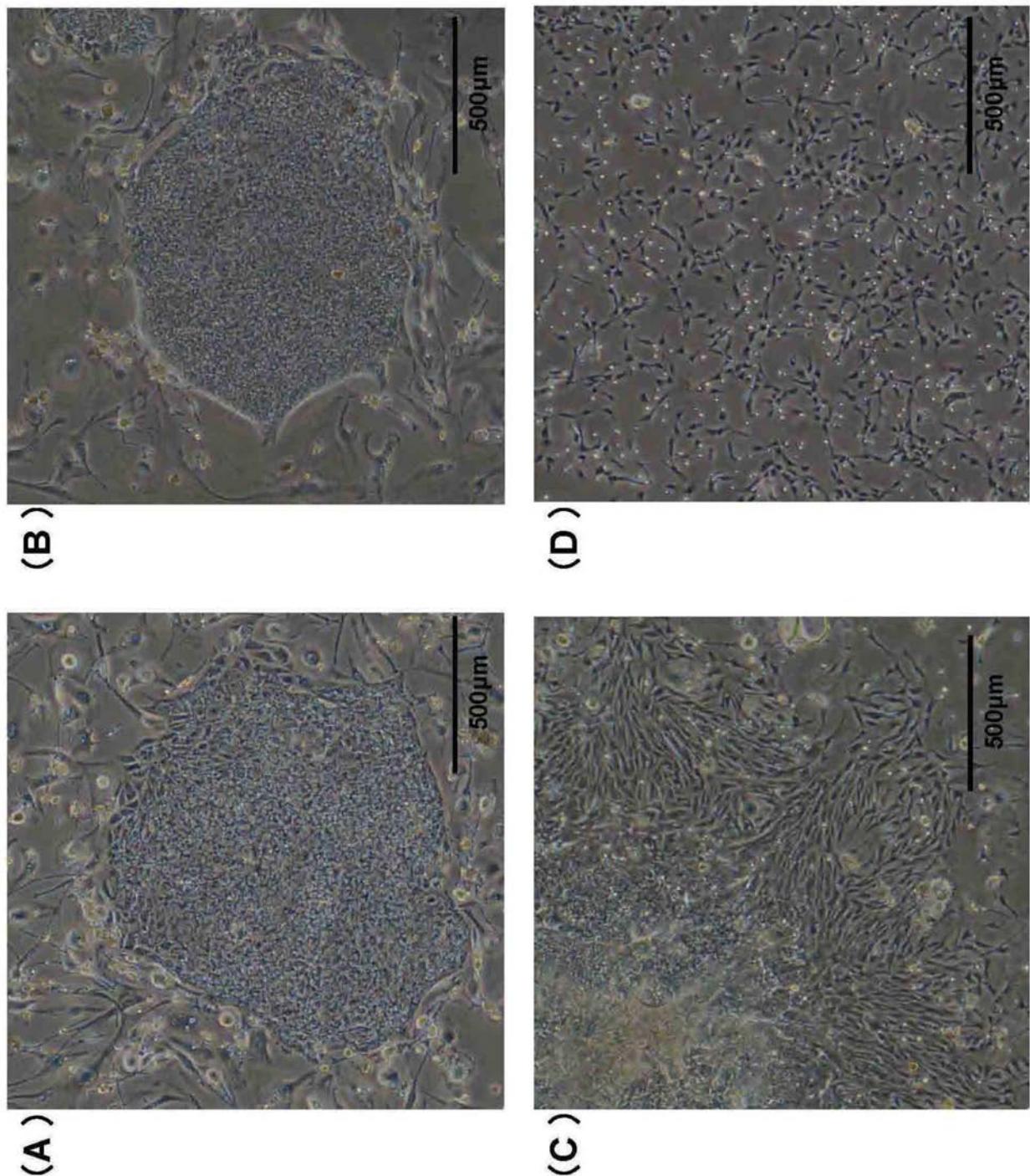


图1

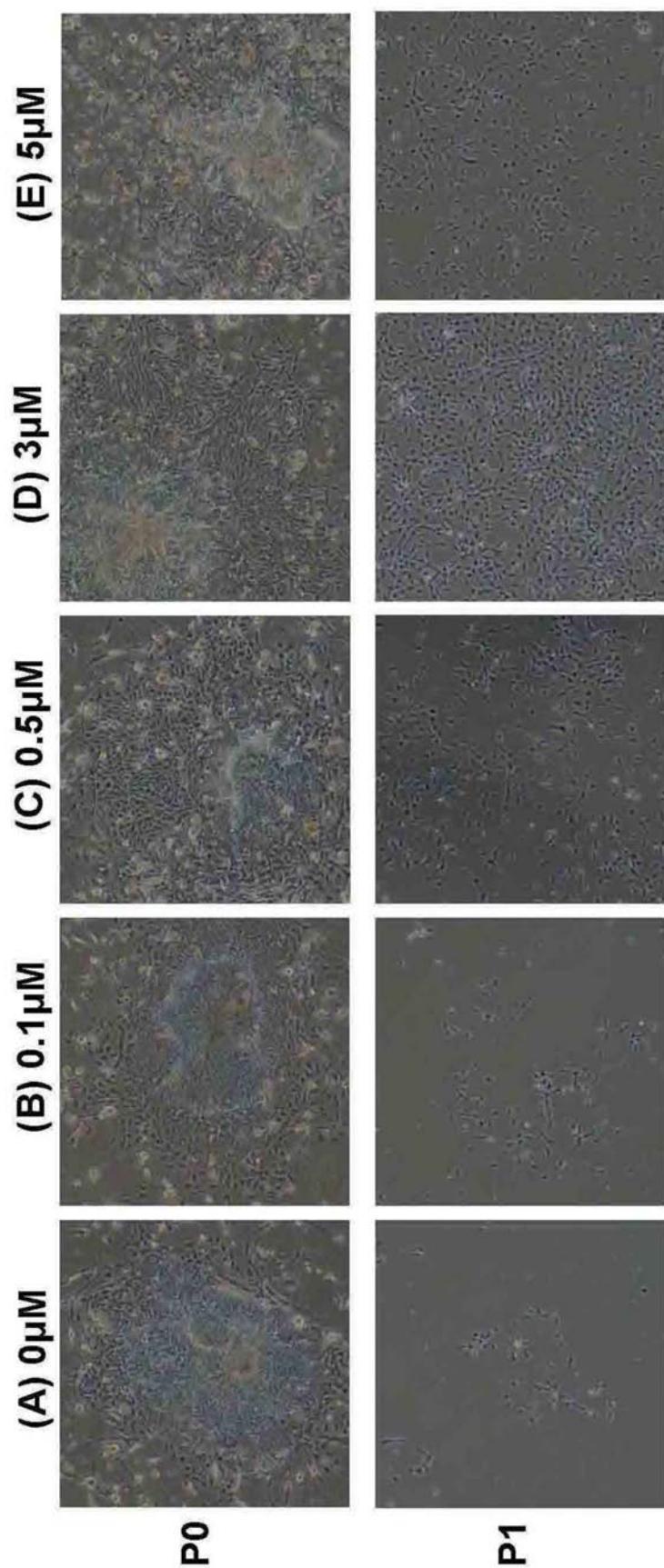


图2

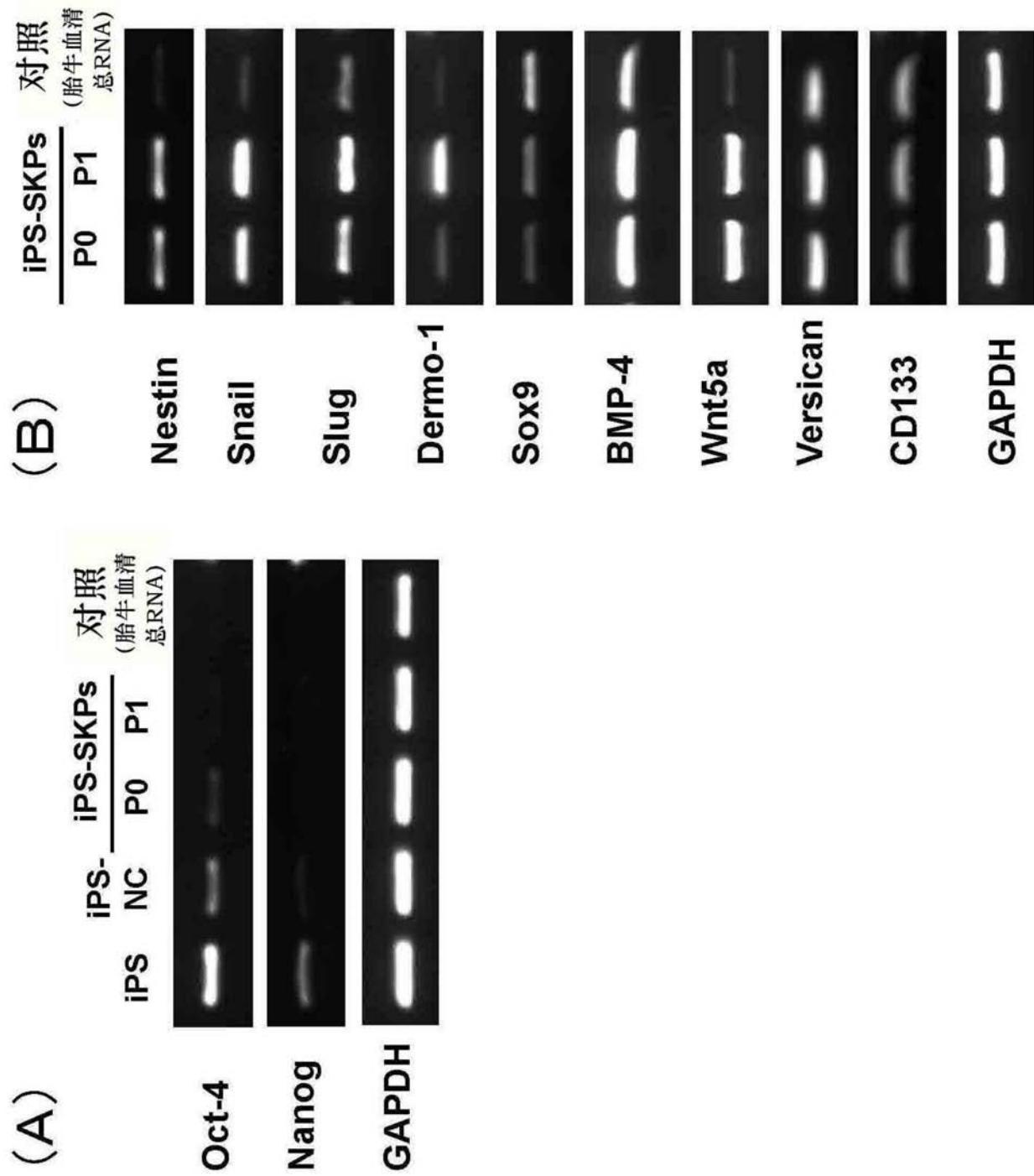


图3

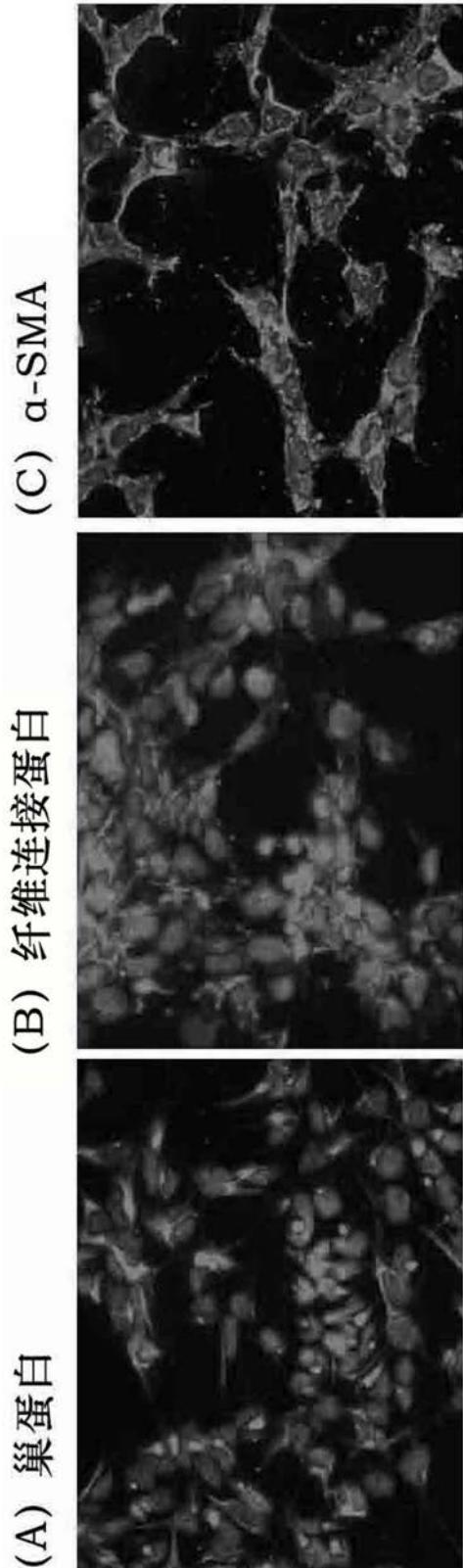
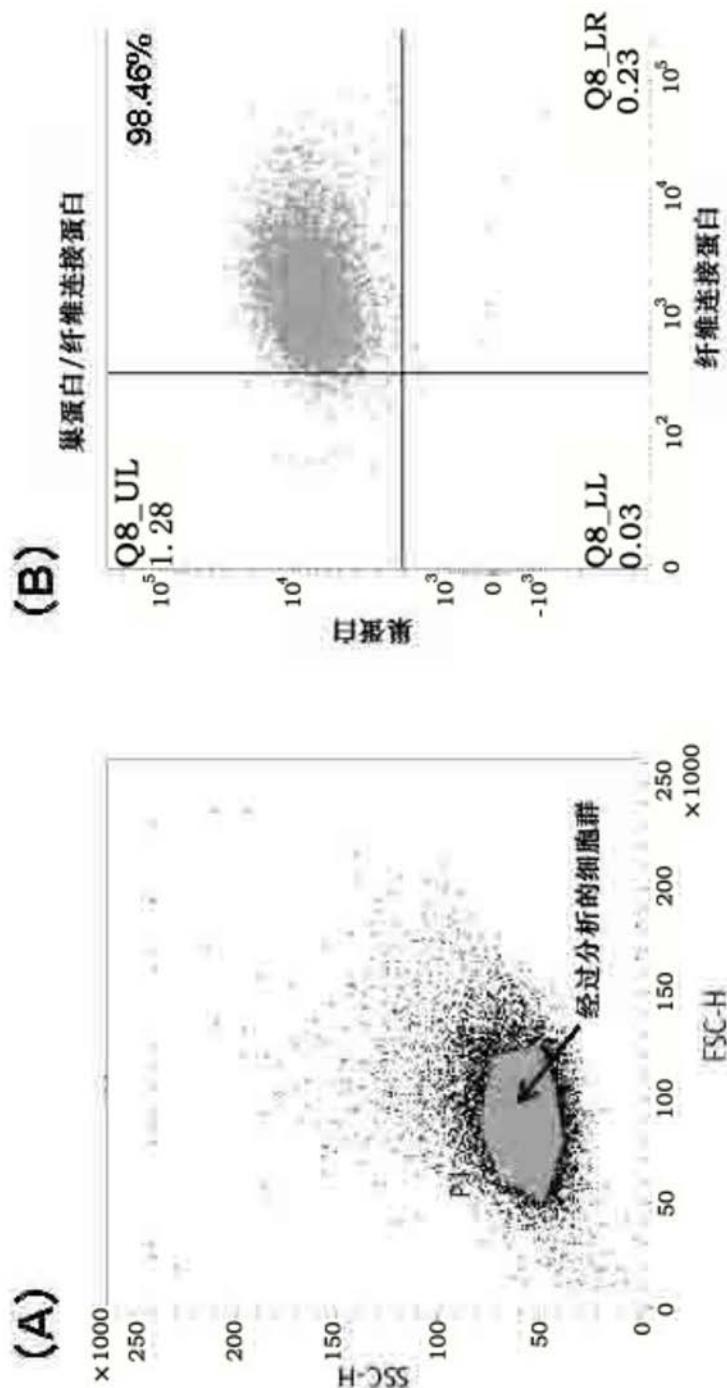


图4



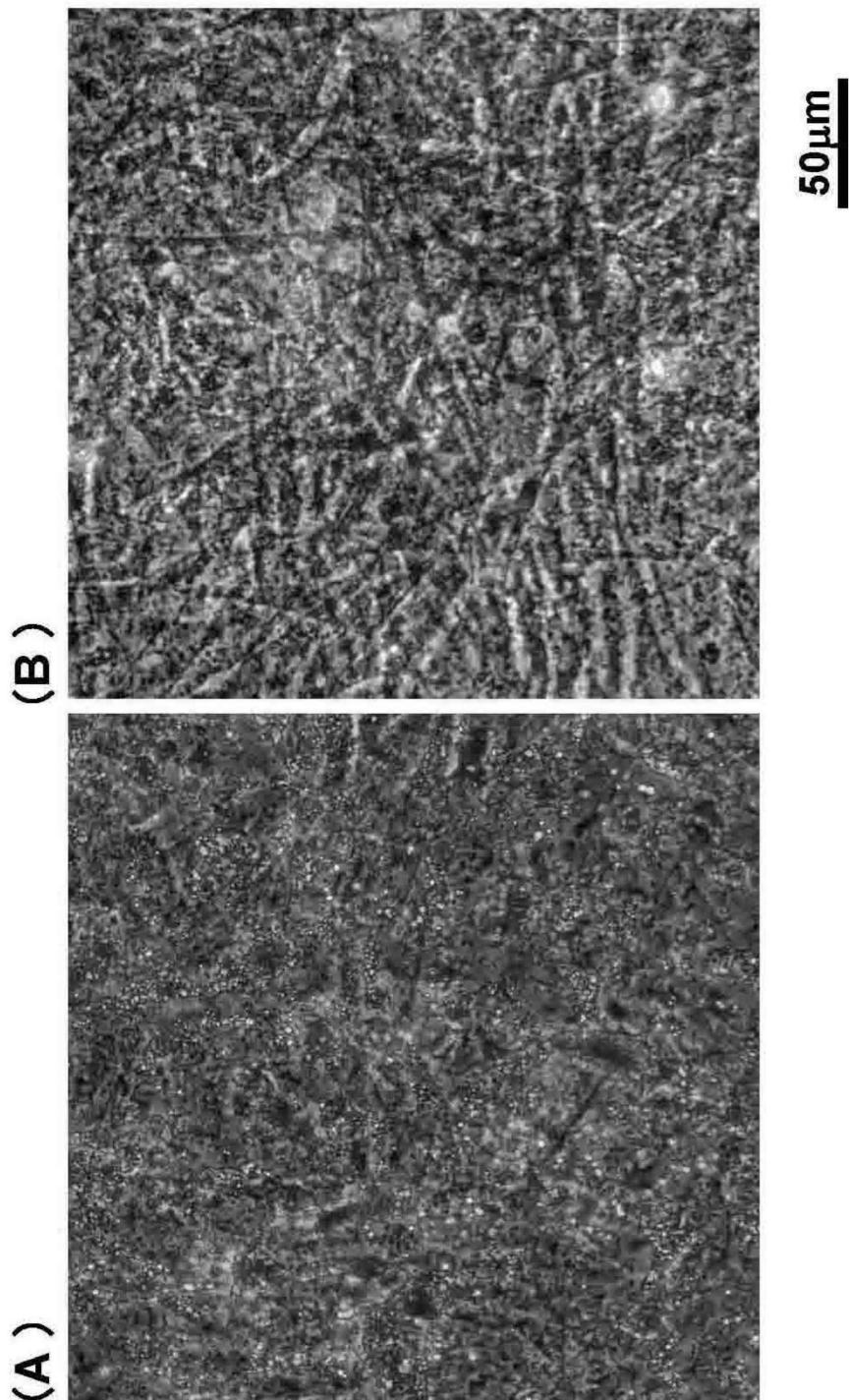


图6

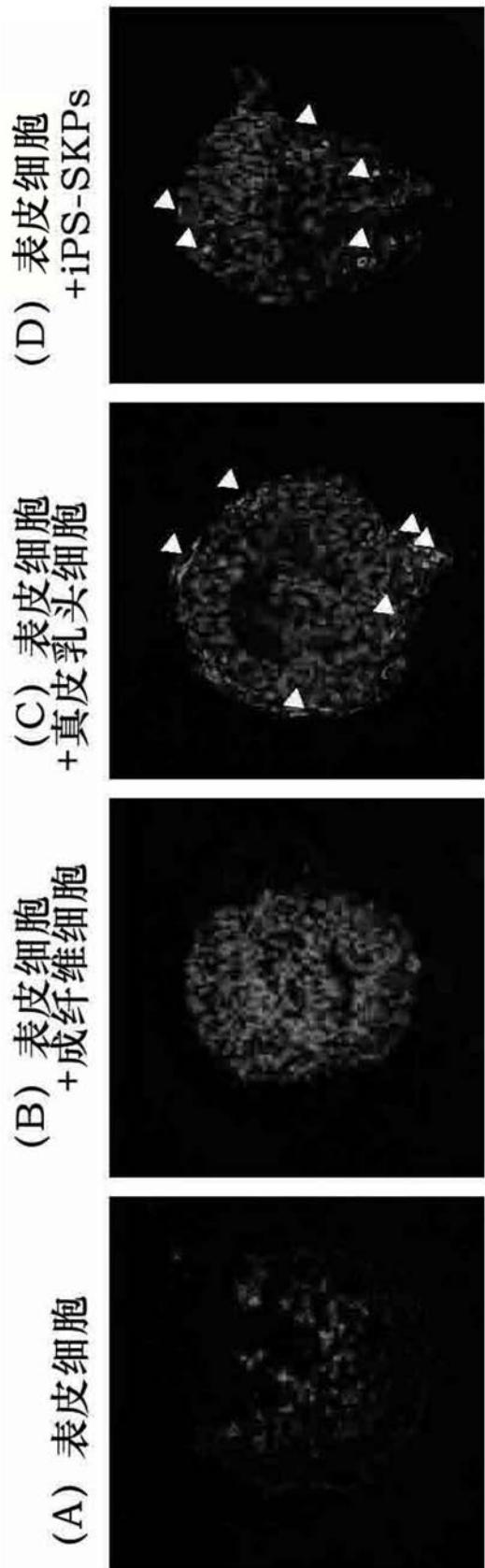


图7

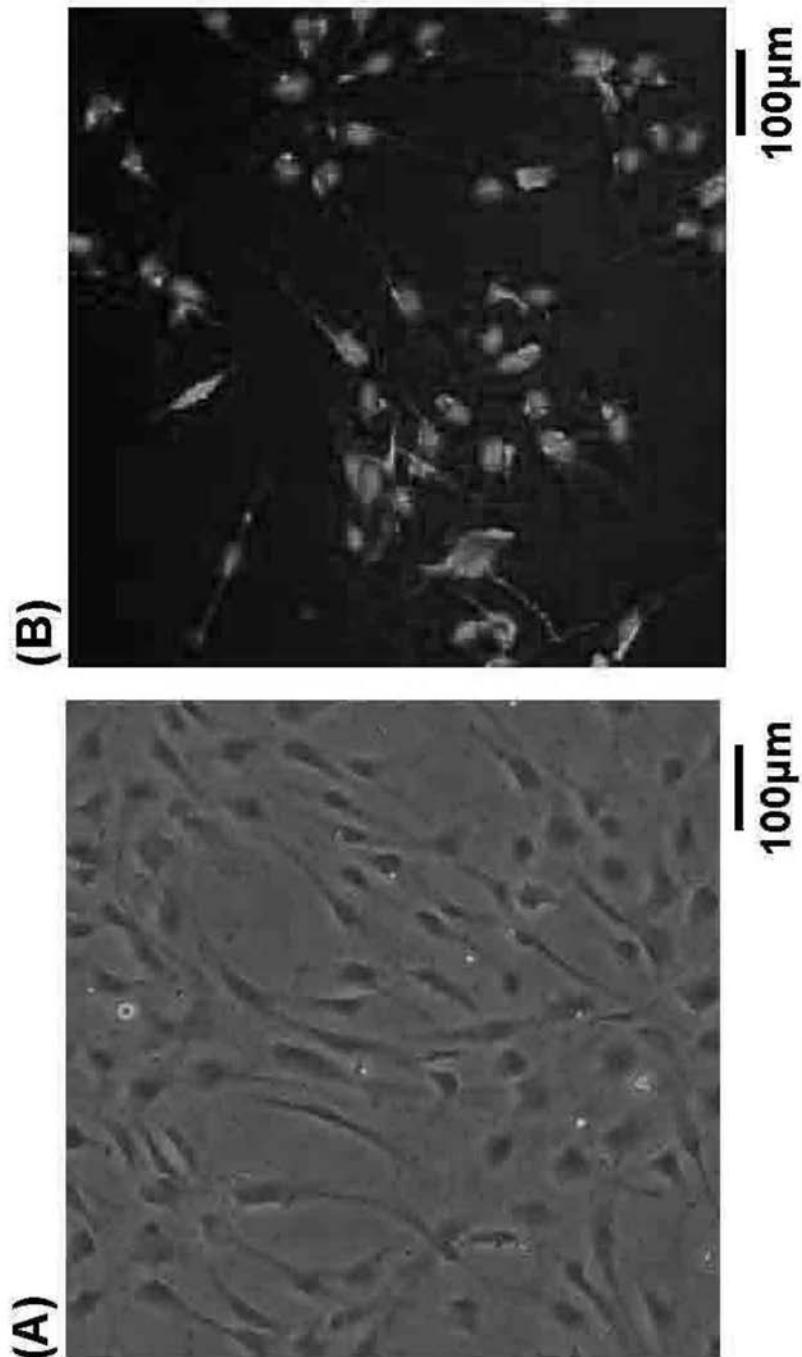


图8

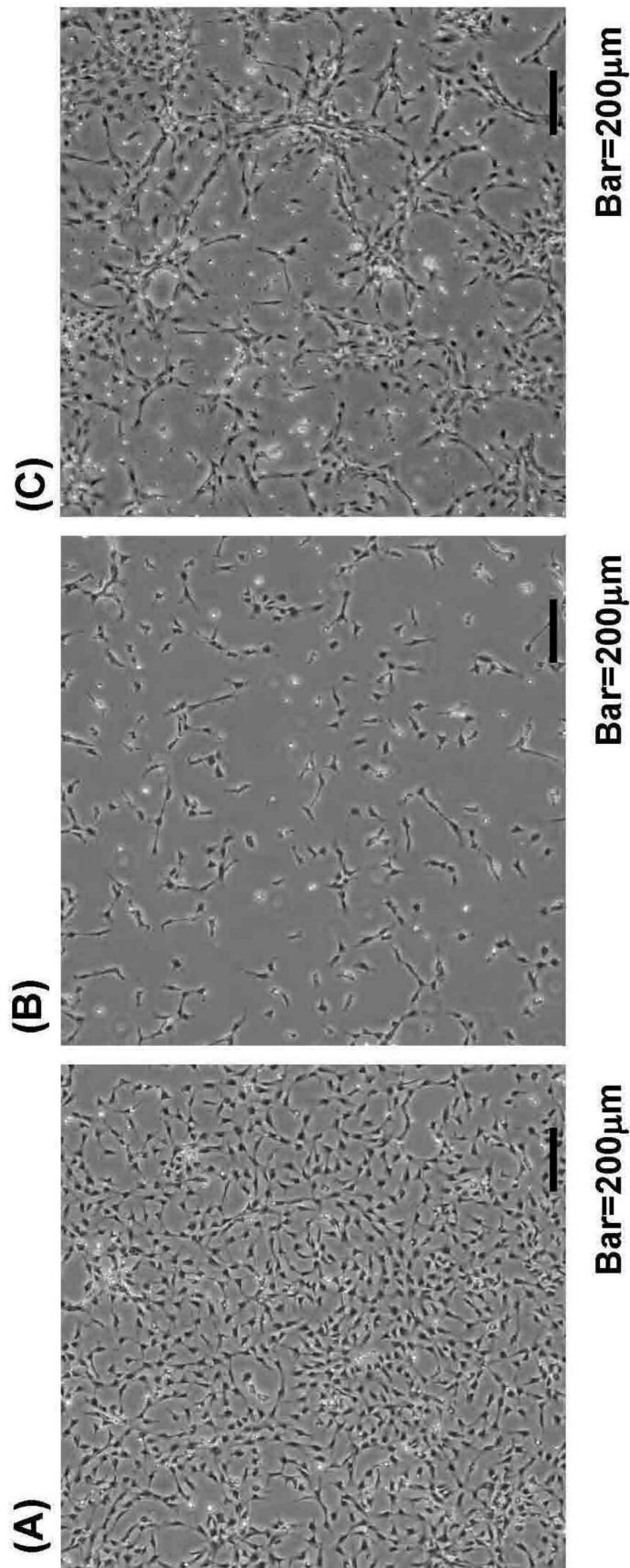


图9

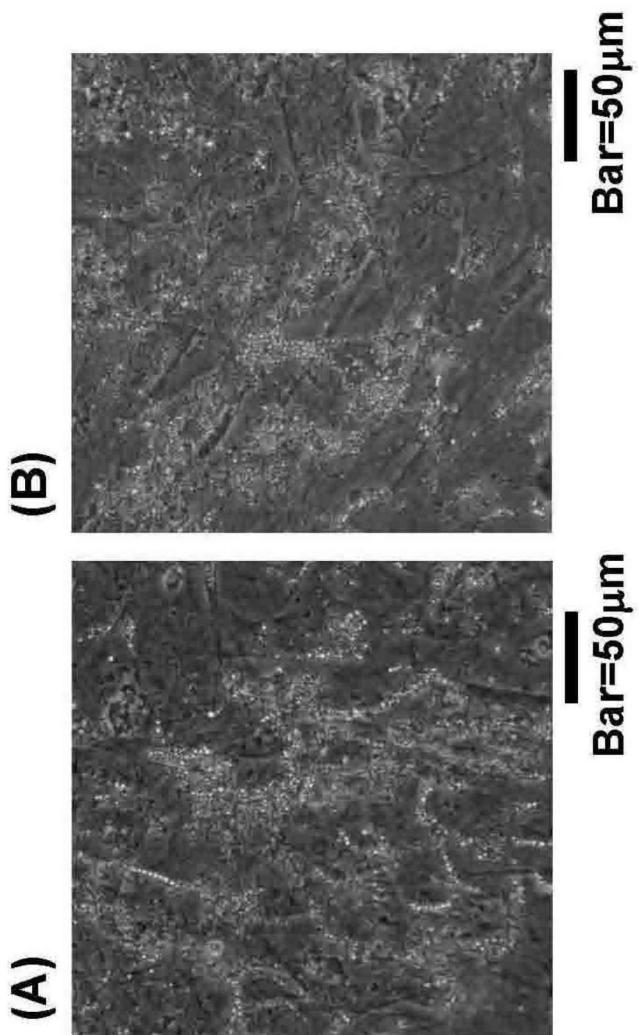


图10

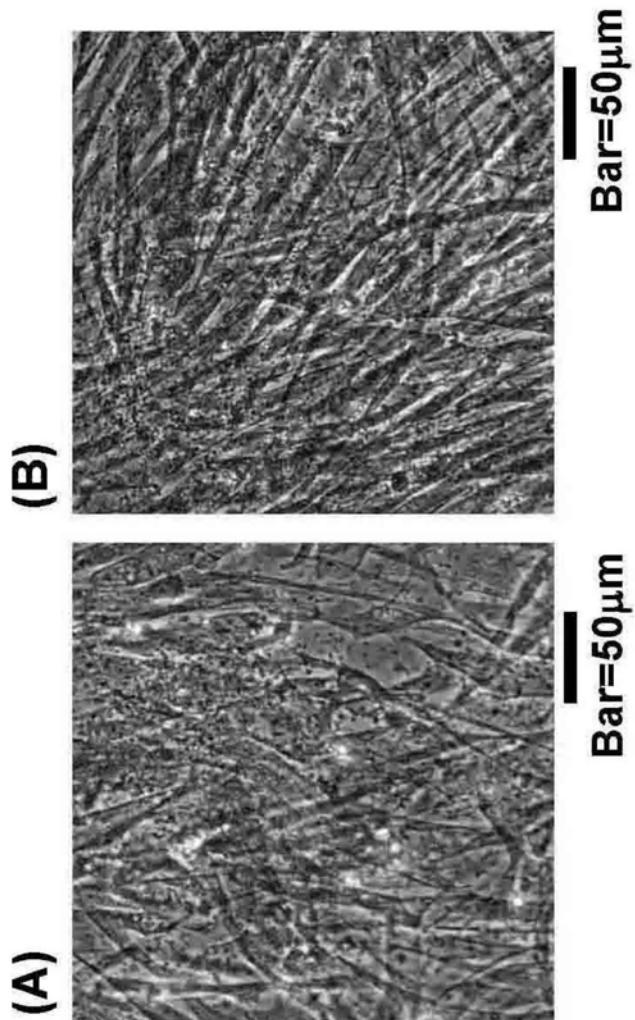


图11