

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6304818号
(P6304818)

(45) 発行日 平成30年4月4日(2018.4.4)

(24) 登録日 平成30年3月16日(2018.3.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 N 5/0797 (2010.01)
C 12 N 5/073 (2010.01)
C 12 N 1/38 (2006.01)

C 12 N 5/10
C 12 N 5/0797
C 12 N 5/073
C 12 N 1/38 Z N A

請求項の数 5 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2014-260434 (P2014-260434)
(22) 出願日 平成26年12月24日 (2014.12.24)
(65) 公開番号 特開2015-213495 (P2015-213495A)
(43) 公開日 平成27年12月3日 (2015.12.3)
審査請求日 平成29年5月1日 (2017.5.1)
(31) 優先権主張番号 特願2014-87247 (P2014-87247)
(32) 優先日 平成26年4月21日 (2014.4.21)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000000918
花王株式会社
東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
O号
(74) 代理人 100076439
弁理士 飯田 敏三
(74) 代理人 100141771
弁理士 星野 宏和
(72) 発明者 中桐 賴子
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
式会社研究所内

審査官 伊達 利奈

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】皮膚由来多能性前駆細胞の作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト由來の多能性幹細胞に由來する神經堤幹細胞を、CHIR99021（商品名）、ビス-インドロ（インジルビン）化合物、NSC693868（商品名）、SB216763（商品名）、SB415286（商品名）、及びTWS119（商品名）からなる群より選ばれる少なくとも1種のWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養して、前記多能性幹細胞を、ネスチン及びフィブロネクチンと共に発現する皮膚由來多能性前駆細胞に分化させる、皮膚由來多能性前駆細胞の作製方法であって、

前記分化誘導培地の基礎培地がD-MEM/Ham's F12培地であり、

前記分化誘導培地が、B-27（登録商標）サプリメント、並びにEGF及びbFGFからなる群より選ばれる少なくとも1種の栄養因子をさらに含有する、皮膚由來多能性前駆細胞の作製方法。 10

【請求項 2】

前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1に記載の作製方法。

【請求項 3】

前記分化誘導培地を用いて分化させた皮膚由來多能性前駆細胞に対して1回又は2回以上の継代培養を行う、請求項1又は2に記載の作製方法。

【請求項 4】

ヒト由來の多能性幹細胞に由來する神經堤幹細胞を、ネスチン及びフィブロネクチンと共に発現する皮膚由來多能性前駆細胞に分化させるための分化誘導培地であって、 20

—分化誘導促進剤として、CHIR99021（商品名）、ビス-インドロ（インジルビン）化合物、NSC693868（商品名）、SB216763（商品名）、SB415286（商品名）、及びTWS119（商品名）からなる群より選ばれる少なくとも1種のWntシグナルのアゴニストを含有し、

B27（登録商標）サプリメント、EGF及びbFGFを含有し、

基礎培地がD-MEM/Ham's F12培地である、分化誘導培地。

【請求項5】

CHIR99021（商品名）、ビス-インドロ（インジルビン）化合物、NSC693868（商品名）、SB216763（商品名）、SB415286（商品名）、及びTWS119（商品名）からなる群より選ばれる少なくとも1種のWntシグナルのアゴニストを有効成分とする、ヒト由来の多能性幹細胞に由来する神経堤幹細胞を、ネスチン及びフィプロネクチンと共に発現する皮膚由来多能性前駆細胞に分化させるための分化誘導促進剤。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚由来多能性前駆細胞の作製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、病気や事故などによって失われた細胞、組織、器官の再生や機能を回復させる再生医療が注目を浴びている。そして、再生医療の現場では、外科的治療や不慮の事故などで失われた細胞、組織、器官の再生などに、人工的に培養した細胞や組織を用いる治療が種々試みられている。また、毛包を再生する技術は、外見面（社会的側面）、健康面などから人々のクオリティ・オブ・ライフ（QOL）の向上に重要な意味を持つ。 20

【0003】

細胞や組織の人工的な培養に用いる細胞源の1種として、皮膚由来多能性前駆細胞（以下、本明細書において「SKPs」ともいう）が知られている。SKPsは毛乳頭に存在し、神経細胞、グリア細胞（神経膠細胞）、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、真皮線維芽細胞、毛乳頭細胞などに分化することが可能な細胞である。そしてSKPsは、真皮環境の維持、組織修復、毛包形成等に重要な機能を果たす細胞である（非特許文献1及び2参照）。

そのため再生医療の現場では、外科的治療や不慮の事故などで失われた細胞、組織、器官の再生のために、SKPsを効率よく大量に入手する方法の開発が求められている。さらに、QOLの向上に資する毛包の再生のためにも、SKPsを効率よく大量に入手する方法が望まれている。 30

【0004】

これまでに報告されているSKPsの入手方法としては、ヒト又はヒト以外の動物組織から浮遊細胞塊として採取培養する方法や（例えば非特許文献1参照）、ヒト又はヒト以外の動物組織から接着培養した細胞より作成する方法（例えば非特許文献3参照）がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Jean G.Toma, et al., *Nature Cell Biology*, vol. 3, p. 778-784 (2001) 40

【非特許文献2】J.Biemaskie, et al., *Cell Stem Cell*, vol. 5, p. 610-623 (2009)

【非特許文献3】Rebecca P.Hill, et al., *PLoS One.*, vol. 7(11), p. e50742 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

前述のように、SKPsは神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、毛乳頭細胞などに分化可能な細胞であり、再生医療等において有用な細胞である。非特許文献1 50

及び3に記載の方法により、上記の神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、毛乳頭細胞などに分化可能な、SKPsを作製することが可能となった。しかし、非特許文献1及び3に記載の方法では、SKPsの作製効率がまだ十分なものとは言えなかった。

【0007】

そこで本発明は、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、毛乳頭細胞などに分化可能なSKPsを効率的に作製する方法の提供を課題とする。

さらに本発明は、前記方法に好適に用いることができる、分化誘導培地及び分化誘導促進剤の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意検討を行った。その結果、ヒト由来の多能性幹細胞をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養することにより、SKPsを効率的に作製することができることを見出した。本発明はこの知見に基づいて完成するに至った。

【0009】

本発明は、ヒト由来の多能性幹細胞をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養して、前記多能性幹細胞をSKPsに分化させる、SKPsの作製方法に関する。

また本発明は、ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導培地であって、分化誘導促進剤としてWntシグナルのアゴニストを含有する、分化誘導培地に関する。

さらに本発明は、Wntシグナルのアゴニストを有効成分とする、ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明のSKPsの作製方法は、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、毛乳頭細胞などに分化可能なSKPsを効率的に作製することができる。

さらに、本発明の分化誘導培地及び分化誘導促進剤は、前記方法に好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1(A)はヒト人工多能性幹細胞(以下、「iPS細胞」ともいう)の顕微鏡写真を示し、図1(B)はヒトイPS細胞由来神経堤幹細胞の顕微鏡写真を示し、図1(C)はヒトイPS細胞由来神経堤幹細胞をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養することで得られたSKPsの顕微鏡写真を示し、図1(D)はヒトイPS細胞由来神経堤幹細胞をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養することで得られたSKPsを継代培養して得られた細胞の顕微鏡写真を示す。

【図2】分化誘導を行う際のWntシグナルのアゴニストの濃度を変えて培養し、ヒトイPS細胞由来神経堤幹細胞から分化したSKPsの顕微鏡写真を示す図である。図2(A)はアゴニスト無添加(0 μM)の培地で培養した場合、図2(B)はアゴニストを0.1 μMの濃度で添加した培地で培養した場合、図2(C)はアゴニストを0.5 μMの濃度で添加した培地で培養した場合、図2(D)はアゴニストを3 μMの濃度で添加した培地で培養した場合、図2(E)はアゴニストを5 μMの濃度で添加した培地で培養した場合に得られた細胞の顕微鏡写真を示す。ここで、P0は継代培養前の細胞の顕微鏡写真を示し、P1は継代培養後の細胞の顕微鏡写真を示す。

【図3】図3(A)はSKPsへの分化誘導前後におけるヒトイPS細胞の未分化時に発現する遺伝子群の発現を比較した電気泳動写真を示し、図3(B)はSKPsへの分化誘導後におけるSKPsに特有の因子の発現を比較した電気泳動写真を示す。

【図4】図4(A)は継代培養後のSKPsにおけるネスチンの発現を示す蛍光顕微鏡写真であり、図4(B)は継代培養後のSKPsにおけるフィプロネクチンの発現を示す蛍光顕微鏡写真であり、図4(C)は継代培養後のSKPsにおけるスムースマッスルアクチン(-S

10

20

30

40

50

MA) の発現を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図5】図5はiPS細胞から分化誘導したSKPsについてフローサイトメトリー解析を行った結果を示す図である。図5(A)は、個々の細胞の側方散乱光(SSC)と前方散乱光(FSC)から、iPS細胞由来SKPsの細胞集団を検出し、解析する細胞集団(生細胞群)を選択した図を示す。図5(B)は図5(A)で選択した細胞群に対し抗フィプロネクチン抗体及び抗ネスチニン抗体で染色した場合の、蛍光強度と細胞数との関係を示した図である。

【図6】図6(A)はヒトiPS細胞から誘導したSKPsをさらに脂肪細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、Oil Red O染色を行った脂肪細胞の顕微鏡写真を示し、図6(B)はヒトiPS細胞から誘導したSKPsをさらに骨細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、アルカリリフォスファターゼ染色を行った骨細胞の顕微鏡写真を示す。

10

【図7】ヒトiPS細胞から作製したSKPsの毛包誘導能を示した図である。図7(A)は表皮細胞のみをスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色した蛍光顕微鏡写真を示す。図7(B)は表皮細胞と線維芽細胞を混合してスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。図7(C)は表皮細胞と毛乳頭細胞を混合してスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。図7(D)は表皮細胞とiPS細胞由来SKPsを混合してスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。なお、図中の矢印はトリコヒアリンの発現を示す。

【図8】図8(A)はヒトiPS細胞から誘導したSKPsをさらにシュワン細胞へ3週間分化誘導した細胞の顕微鏡写真を示し、図8(B)は図8(A)の細胞に対し抗S100抗体を用いて染色した細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。

20

【図9】図9(A)は凍結保存前のSKPsの顕微鏡写真を示し、図9(B)は図9に示すSKPsの一部を緩慢法にて凍結保存後、融解し1日間培養後の細胞の顕微鏡写真を示し、図9(C)は図9(B)に示す細胞をさらに3日間増殖培養した細胞の顕微鏡写真を示す。

【図10】図10(A)は凍結保存前のSKPsをさらに脂肪細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、Oil Red O染色を行った脂肪細胞の顕微鏡写真を示し、図10(B)は凍結融解後のSKPsを培養し、さらに脂肪細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、Oil Red O染色を行った脂肪細胞の顕微鏡写真を示す。

【図11】図11(A)は凍結保存前のSKPsをさらに骨細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、アルカリリフォスファターゼ染色を行った骨細胞の顕微鏡写真を示し、図11(B)は凍結融解後のSKPsを培養し、さらに骨細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、アルカリリフォスファターゼ染色を行った骨細胞の顕微鏡写真を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明のSKPsの作製方法では、多能性幹細胞の培養をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地を用いて行う。これにより多能性幹細胞のSKPsへの分化誘導を行う。Wntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で多能性幹細胞を培養することで多能性幹細胞の分化効率が向上し、SKPsを効率的に作製することができる。

以下、本発明の好ましい実施態様に基づいて本発明を詳細に説明する。しかし、本発明はこれに制限するものではない。

40

【0013】

本明細書において「皮膚由来多能性前駆細胞(SKPs)」とは自己複製能を有する未分化細胞であり、神経細胞、グリア細胞(例えば、マイクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、シュワン細胞、衛星細胞など)、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、真皮線維芽細胞、毛乳頭細胞などに分化する能力を有する細胞をいう。

【0014】

本明細書において「多能性幹細胞」とは、成体を構成する種々の組織に分化できる多能性と自己複製能を有する未分化細胞を指す。本発明で用いる多能性幹細胞は適宜選択することができ、多能性幹細胞の具体例としては、胚性幹細胞(以下、「ES細胞」ともいう)、胚性腫瘍細胞(以下「EC細胞」ともいう)、胚性生殖幹細胞(以下、「EG細胞」ともい

50

う)、iPS細胞、が挙げられる。これらの細胞は常法により調製してもよいし、市販の細胞を用いてもよい。

【0015】

本発明で用いるヒト由来の多能性幹細胞は、ES細胞又はiPS細胞が好ましく、iPS細胞がより好ましい。

本発明で好ましく用いることができるヒト由来の多能性幹細胞の具体例としては、着床以前の初期胚を培養することによって樹立したヒトES細胞、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立したヒトES細胞、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、C-Myc遺伝子及びSox2遺伝子などの未分化状態の維持、誘導に必要な因子を皮膚細胞等の体細胞に導入して得られるヒトiPS細胞、特定の化合物で皮膚細胞等の体細胞を処理することにより得られるヒトイPS細胞等様々な方法で樹立されたヒトイPS細胞が挙げられる。
10

【0016】

多能性幹細胞の培養方法について説明する。

本発明では、Wntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地を用いて多能性幹細胞を培養する。ここで**本明細書において**、「Wntシグナル」とは、-カテニンの核移行を促し、転写因子としての機能を発揮する一連の作用をいう。ここでいうWntシグナルには、細胞間相互作用に起因し、例えば、ある細胞から分泌されたWnt3Aというタンパク質がさらに別の細胞に作用し、細胞内の -カテニンが核移行し、転写因子として作用する一連の流れも含まれる。この一連の流れは、上皮間葉相互作用を例とする器官構築の最初の現象を引き起こす。Wntシグナルは -カテニン経路、PCP経路、及びCa²⁺経路の3つの経路を活性化することにより、細胞の増殖や分化、器官形成や初期発生時の細胞運動など各種細胞機能を制御することが知られる。
20

【0017】

本発明では、市販のWntシグナルのアゴニストを用いてもよいし、常法に従い調製したWntシグナルのアゴニストを用いてもよい。Wntシグナルのアゴニストとしては、アミノピリミジン化合物（例えば、CHIR99021（商品名））、ビス-インドロ（インジルビン）化合物（以下、「B10」ともいう）（例えば、(2'Z, 3'E)-6-ブロモインジルビン-3'-オキシム）、B10のアセトキシム化合物（以下、「B10-アセトキシム」ともいう）（例えば、(2'Z, 3'E)-6-ブロモインジルビン-3'-アセトキシム）、チアジアゾリジン(TDZD)化合物（例えば、4-ベンジル-2-メチル-1,2,4-チアジアゾリジン-3,5-ジオン）、オキソチアジアゾリジン-3-チオン化合物（例えば、2,4-ジベンジル-5-オキソチアジアゾリジン-3-チオン）、チエニル -クロロメチルケトン化合物（例えば、2-クロロ-1-(4,4-ジブロモ-チオフェン-2-イル)-エタノン）、フェニル ブロモメチルケトン化合物（例えば、-4-ジブロモアセトフェノン）、チアゾール含有尿素化合物（例えば、N-(4-メトキシベンジル)-N'-(5-ニトロ-1,3-チアゾール-2-イル)ユレア）、GSK-3 ペプチド阻害剤（例えばH-KEAPPAPPQSpP-NH₂）等が挙げられる。本発明で用いるWntシグナルのアゴニストとしては、CHIR99021、B10、NSC693868（商品名）、SB216763（商品名）、SB415286（商品名）、TWS119（商品名）等から選ばれる少なくとも1種が好ましく、CHIR99021がさらに好ましい。
30

【0018】

分化誘導培地に含まれるWntシグナルのアゴニストの含有量は、培養条件、使用する多能性幹細胞の種類、使用するWntシグナルのアゴニストの種類等に応じて、Wntシグナルが活性化され、かつ細胞増殖が停止しない範囲で適宜設定することができる。例えば、WntシグナルのアゴニストとしてCHIR99021を用いる場合、培地中のWntシグナルのアゴニストの濃度は0.5 μM以上が好ましく、2 μM以上がより好ましく、そして、5 μM以下が好ましく、4 μM以下がより好ましい。また、Wntシグナルのアゴニストの濃度範囲は0.5~5 μMが好ましく、2 μM~4 μMがより好ましい。また、Wntシグナルのアゴニストの濃度は、3 μMとするのが特に好ましい。
40

【0019】

10

20

30

40

50

多能性幹細胞の培養に用いる分化誘導培地は、幹細胞を培養するのに通常用いられる培地に所定量のWntシグナルのアゴニストを含有させることで調製することができる。

分化誘導培地の基礎培地は幹細胞を培養するのに通常用いられる培地から適宜選択することができる。例えば、MEM培地 (Minimum Essential Medium)、BME培地 (Basal Medium Eagle)、IMDM培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、D-MEM培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、ハム培地、RPMI培地 (Roswell Park Memorial Institute medium)、Fischer's培地、及びこれらの混合培地が挙げられる。このうち、D-MEM/Ham's F12培地（以下、単に「D-MEM/F12」ともいう）が好ましい。

【0020】

本発明で用いる分化誘導培地は、血清含有培地であってもよいし、無血清培地であってもよいし、血清代替物を含有する培地であってもよい。本発明で用いることができる血清代替物としては、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレンなど）、栄養因子（EGF（上皮成長因子）、bFGF（塩基性線維芽細胞増殖因子）等）、B-27サプリメント、N2サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノールが挙げられる。本発明で用いる分化誘導培地は、B-27サプリメント、並びにEGF及びbFGFからなる群より選ばれる少なくとも1種の栄養因子を含有する培地であることが好ましく、B27サプリメント、EGF及びbFGFを含有する培地であることがより好ましい。

さらには、必要に応じてフィーダー細胞、ビタミン、緩衝剤、無機塩類、抗生物質（例えば、ペニシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン）等、幹細胞の培地に通常用いられる成分を分化誘導培地に含有させてもよい。

【0021】

多能性幹細胞からSKPsへの分化誘導は、使用する多能性幹細胞の培養に適した培養温度で、SKPsへと分化誘導するに十分な期間培養することによって実施される。例えば、多能性幹細胞としてiPS細胞を用いる場合には、好ましくは1～20日間培養する。

【0022】

本発明では、多能性幹細胞から直接SKPsへと分化誘導してもよいし、予め多能性幹細胞を神経堤幹細胞又は中胚葉（好ましくは神経堤幹細胞）に分化させ、分化した神経堤幹細胞又は中胚葉（好ましくは神経堤幹細胞）をSKPsに分化させてもよい。神経堤幹細胞などを経て多能性幹細胞をSKPsに分化させることで、さらに効率よくSKPsを作製することができる。神経堤幹細胞からSKPsに分化させる際の培養条件は適宜設定することができる。例えば、Wntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で、好ましくは3～5日間、より好ましくは4日間、神経堤幹細胞を培養することで、効率的にSKPsに分化させることができる。

ここで「神経堤幹細胞」とは、自己複製能と多分化能を有する多能性の幹細胞であり、脊椎動物の発生過程では神経管の背側から体中に移動し、様々な組織の形成に寄与する細胞をいう。なお、多能性幹細胞から神経堤幹細胞への分化誘導、及び神経堤幹細胞への分化の確認は、常法に従って実施することができる。

【0023】

本発明において、前記分化誘導培地を用いて分化させたSKPsに対して1回又は2回以上の継代培養を行うことが好ましい。継代培養を行うことで、純度の高い細胞集団としてSKPsを得ることができる。

前記多能性幹細胞及びSKPsの継代方法及び継代回数は、細胞の種類、培養方法などに応じて通常の継代方法から適宜選択することができる。例えば、接着培養系細胞については酵素等による細胞の剥離後、希釈培養により継代を行い、浮遊培養系細胞については希釈培養により継代を行う。

本発明は、接着培養及び浮遊培養のいずれの方法により実施することができるが、接着培養の条件下で行うのが好ましい。

【0024】

本発明のSKPsの作製方法によれば、分離回収が不要なレベルの割合でSKPsに分化した細

10

20

30

40

50

胞を作製することができるが、常法によりSKPsに分化した細胞の分離回収を行ってもよい。SKPsに分化した細胞の分離回収方法としては例えば、セルソーターを用いた方法、磁気ビーズを用いた方法などが挙げられる。

【0025】

多能性幹細胞又は神経堤幹細胞からSKPsへ分化誘導されたことの確認は、これらの細胞としての機能を発揮するためのタンパク質や当該タンパク質をコードする遺伝子（以下、これらを単に「マーカー」ともいう）の発現の有無や、顕微鏡観察による細胞形態などを評価することによって行うことができる。例えば、タンパク質の発現は抗原抗体反応を利用した方法等によって確認することができ、遺伝子の発現はノーザンプロット法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）などを利用した方法等によって確認することができる。10

【0026】

特定の遺伝子の発現の有無によりSKPsへの分化誘導を確認する場合、マーカー遺伝子としては、Oct-4遺伝子、Nanog遺伝子、Nestin遺伝子、Snail遺伝子、Slug遺伝子、Dermo-1遺伝子、Sox9遺伝子、BMP-4遺伝子、Wnt-5a遺伝子、Versican遺伝子、CD133遺伝子、などを利用することができる。

前記遺伝子のうち、分化前のiPS細胞に発現し、他の細胞へ分化することにより発現が減少する遺伝子として、Oct-4遺伝子、Nanog遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子の発現量の減少を確認することで、iPS細胞がSKPsに分化したことを確認することができる。さらに、SKPsに発現することが報告されている因子として、Nestin遺伝子、Snail遺伝子、Slug遺伝子、Dermo-1遺伝子、Sox9遺伝子、BMP-4遺伝子、Wnt-5a遺伝子、Versican遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子の発現を確認することでも、iPS細胞がSKPsに分化したことを確認することができる。さらに、神経堤由来及び間葉系由来の毛乳頭細胞のいずれでも発現が報告されている因子として、CD133遺伝子が挙げられる。20

【0027】

特定のタンパク質の発現の有無によりSKPsへの分化誘導を確認する場合、マーカータンパク質としては、ネスチン、-SMA、フィブロネクチン、などを利用することができる。これらは、SKPsでの発現が報告されているタンパク質であるので、これらのマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行うことによりSKPsへの分化誘導の確認を行うことができる。

【0028】

後述の実施例で示すように、Wntシグナルのアゴニストが多能性幹細胞（好ましくは神経堤細胞）のSKPsへの分化誘導を促進し、多能性幹細胞の分化効率を向上させる作用を示す。この知見に基づいて、本発明は、多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤としてWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地、及びWntシグナルのアゴニストを有効成分として含有し、多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤、も提供する。

また、多能性幹細胞をSKPsに分化させるための非治療的な分化誘導方法のために、Wntシグナルのアゴニストを使用することができる。本明細書において、「非治療的」とは、医療行為、すなわち治療による人体への処置行為を含まない概念である。

前記分化誘導培地及び分化誘導促進剤におけるWntシグナルのアゴニストの含有量は、多能性幹細胞の培養条件など、これらの使用形態に応じて適宜設定することができる。40

【0029】

本発明のSKPsの作製方法によればSKPsを効率的に作製することができる。そして、本発明のSKPsの作製方法により得られたSKPsを神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、真皮線維芽細胞、又は毛乳頭細胞など、目的の細胞に分化誘導することにより、これらの細胞を効率的に作成することができる。

【0030】

SKPsを目的の細胞に分化誘導させる際の培養方法、培地の組成、分化誘導方法、継代方法は、常法に従い適宜設定することができる。

また、目的の細胞への分化の確認も、常法に従い行うことができる。例えば、脂肪細胞50

に分化させた場合、Oil Red O染色法により細胞内脂質を染色し、染色の有無を確認することで脂肪細胞への分化を確認することができる。また、骨細胞に分化させた場合、アルカリフォスファターゼ染色法により染色し、染色の有無を確認することで骨細胞への分化を確認することができる。また、毛乳頭細胞に分化させた場合、トリコヒアリンなどのマーカータンパク質の発現の有無を免疫組織蛍光染色法により評価することで、上皮細胞との相互作用により上皮細胞における毛包様の角化を誘導できる能力、つまり、毛乳頭細胞としての機能を確認することができる。また、グリア細胞の1種であるシュワン細胞に分化させた場合、抗S100 抗体を用いて細胞を染色し、染色の有無を確認することでシュワン細胞への分化を確認することができる。

SKPsからさらに分化した細胞は、それぞれの細胞の種類に応じて常法に従って分離回収することができる。 10

【0031】

本発明により得られる、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、真皮線維芽細胞、毛乳頭細胞などの、SKPsから分化させた目的の細胞は、外科的治療や不慮の事故などで失われた細胞、組織、器官の再生や、毛包の再生などに好適に用いることができる。

【0032】

上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下の細胞の作製方法、分化誘導培地、分化誘導促進剤、使用並びに方法を開示する。 20

【0033】

<1>ヒト由来の多能性幹細胞をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養して、前記多能性幹細胞をSKPsに分化させる、SKPsの作製方法。

【0034】

<2>前記多能性幹細胞がES細胞又はiPS細胞、好ましくはiPS細胞、である、前記<1>項に記載の作製方法。

<3>前記多能性幹細胞が多能性幹細胞由来神経堤幹細胞である、前記<1>又は<2>項に記載の作製方法。

<4>前記分化誘導培地で3～5日間、好ましくは4日間、前記多能性幹細胞由来神経堤幹細胞を培養してSKPsに分化させる、前記<3>項に記載の作製方法。 30

<5>前記Wntシグナルのアゴニストが、CHIR99021、B10、NSC693868、SB216763、SB4152 86、及びTWS119からなる群より選ばれる少なくとも1種、好ましくはCHIR99021、である、前記<1>～<4>のいずれか1項に記載の作製方法。

<6>前記分化誘導培地中のCHIR99021の含有量が好ましくは0.5 μM以上、より好ましくは2 μM以上であり、好ましくは5 μM以下、より好ましくは4 μM以下であり、あるいは、好ましくは0.5～5 μM、より好ましくは2 μM～4 μMであり、特に好ましくは3 μM、である、前記<5>項に記載の作製方法。

<7>前記分化誘導培地の基礎培地がD-MEM/F12培地である、前記<1>～<6>のいずれか1項に記載の作製方法。

<8>前記分化誘導培地がB-27サプリメント、並びにEGF及びbFGFからなる群より選ばれる少なくとも1種の栄養因子、好ましくはB27サプリメント、EGF及びbFGFをさらに含有する、前記<1>～<7>のいずれか1項に記載の作製方法。 40

<9>SKPsへの分化を接着培養の条件下で行う、前記<1>～<8>のいずれか1項に記載の作製方法。

<10>前記分化誘導培地を用いて分化させたSKPsに対して1回又は2回以上の継代培養を行う、前記<1>～<9>のいずれか1項に記載の作製方法。

<11>セルソーターを用いた方法、磁気ビーズを用いた方法等、常法により、SKPsに分化した細胞を分離回収する、前記<1>～<10>のいずれか1項に記載の作製方法。

<12>目的の細胞を作製する方法であって、前記<1>～<11>のいずれか1項に記載の作製方法により作製したSKPsを目的の細胞にさらに分化させる、目的の細胞を作製する方法。 50

< 1 3 > 前記目的の細胞が、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、真皮線維芽細胞、及び毛乳頭細胞からなる群より選ばれるいずれかの細胞、好ましくは脂肪細胞、骨細胞、グリア細胞及び毛乳頭細胞からなる群より選ばれるいずれかの細胞、である、前記< 1 2 > 項に記載の方法。

【 0 0 3 5 】

< 1 4 > ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導培地であって、分化誘導促進剤としてWntシグナルのアゴニストを含有する、分化誘導培地。

< 1 5 > 前記Wntシグナルのアゴニストが、CHIR99021、B10、NSC693868、SB216763、SB415286、及びTWS119からなる群より選ばれる少なくとも1種、好ましくはCHIR99021、である、前記< 1 4 > に記載の分化誘導培地。 10

< 1 6 > 前記分化誘導培地の基礎培地がD-MEM/F12培地である、前記< 1 4 > 又は< 1 5 > 項に記載の分化誘導培地。

< 1 7 > B-27サプリメント、並びにEGF及びbFGFからなる群より選ばれる少なくとも1種の栄養因子、好ましくはB27サプリメント、EGF及びbFGFをさらに含有する、前記< 1 4 > ~ < 1 6 > のいずれか1項に記載の分化誘導培地。

< 1 8 > 抗生物質、好ましくはペニシリン、カナマイシン及びストレプトマイシン少なくとも1種の抗生物質、より好ましくはペニシリン及びストレプトマイシン、をさらに含有する、前記< 1 4 > ~ < 1 7 > のいずれか1項に記載の分化誘導培地。

【 0 0 3 6 】

< 1 9 > Wntシグナルのアゴニストを有効成分とする、ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤。 20

< 2 0 > ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤としての、Wntシグナルのアゴニストの使用。

< 2 1 > ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤の製造のための、Wntシグナルのアゴニストの使用。

< 2 2 > Wntシグナルのアゴニストを、ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導促進剤として使用する方法。

< 2 3 > ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための分化誘導方法のために用いる、Wntシグナルのアゴニスト。

< 2 4 > ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化させるための非治療的な分化誘導方法のための、Wntシグナルのアゴニストの使用。 30

< 2 5 > Wntシグナルのアゴニストを使用する、ヒト由来の多能性幹細胞をSKPsに分化誘導する方法。

< 2 6 > 前記Wntシグナルのアゴニストが、CHIR99021、B10、NSC693868、SB216763、SB415286、及びTWS119からなる群より選ばれる少なくとも1種、好ましくはCHIR99021、である、前記< 1 9 > ~ < 2 5 > のいずれか1項に記載の使用又は方法。

< 2 7 > 前記多能性幹細胞がES細胞又はiPS細胞、好ましくはiPS細胞、である、前記< 1 9 > ~ < 2 6 > のいずれか1項に記載の使用又は方法。

【 実施例 】

【 0 0 3 7 】

以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【 0 0 3 8 】

試験例 1 iPS細胞の継代培養

(1) ヒトiPS細胞

多能性幹細胞として、ヒト由来のiPS細胞（商品名：クローン201B7、継代数：24、iPSアカデミアジャパン社より購入）を用いた。なお、前記iPS細胞は、レトロウイルスベクターを用い、4種の遺伝子（Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、Klf4遺伝子、c-Myc遺伝子）をヒト皮膚線維芽細胞に導入して得られたiPS細胞である。

【 0 0 3 9 】

(2) フィーダー細胞の作製

前記iPS細胞の培養に用いるフィーダー細胞として、下記方法により作製したSNL76/7細胞（マウス胚由来線維芽細胞株、CELL BIOLABS社製）を用いた。

7質量%ウシ胎児血清（HyClone社製、カタログ番号：SH30070.03E）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、50U、50 μ g / mL）を含むD-MEM培地（Life technologies社製、カタログ番号：11965-092）でSNL76/7細胞を培養した。その後、コンフルエントの細胞をマイトマイシンC（商品名、協和発酵キリン社製、濃度：0.012mg / mL）で2時間処理し、0.25%トリプシン／エチレンジアミン四酢酸で回収した。0.1%ゼラチン（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：G1890）でコートした細胞培養皿上に1×10⁶cells / 100mm dishとなるように、回収した細胞を播種した。24時間後、細胞培養皿に接着した細胞をフィーダー細胞として使用した。
10

【0040】

(3) ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞用培地（hES培地）として、血清代替物（Life technologies社製、カタログ番号：10828-028、20質量%）、L-グルタミン（Life technologies社製、カタログ番号：25030-081、2mM）、非必須アミノ酸（SIGMA社製、カタログ番号：M7145、0.1mM）、2-メルカプトエタノール（Life technologies社製、カタログ番号：21985-023、0.1mM）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、50U、50 μ g / mL）、bFGF（Wako社製、カタログ番号：064-04541、4ng / mL）を含むD-MEM/F12培地（SIGMA社製：D6421）を調製した。この培地を用いて、37℃、5%CO₂のインキュベーターでCelli, 131, p. 861-872 (2007)に記載の方法に従ってヒトiPS細胞を培養した。なお、培地交換は毎日実施した。
20

【0041】

80～90%コンフルエントのiPS細胞を剥離酵素（リプロセル社製、カタログ番号：RCHETP002）で処理し、iPS細胞コロニーを回収した。回収したコロニーはピベッティングにより適切なサイズに碎き、マイトマイシンCで処理した前記SNLフィーダー細胞を事前に準備した培養容器に播種し、37℃、5%CO₂のインキュベーターでiPS細胞を培養した。なお、培地交換は毎日実施した。
30

【0042】

試験例2 ヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞からSKPsへの分化の誘導

(1) ヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞の調製

Nature protocols, 5, p. 688-701 (2010) やCell reports, 3, p. 1140-1152 (2013)に記載の方法に基づいて、試験例1で継代培養したiPS細胞をnoggin (R&D systems社製、カタログ番号：6057-NG-100/CF、500ng / mL)及び／又はSB431542 (TOCRIS社製、カタログ番号：1614、10 μ M)をhES培地(-)bFGFに添加して調製した培地で5日間～2週間培養することにより、ヒトiPS細胞から神経堤幹細胞への分化を誘導した。
40

【0043】

(2) ヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞からSKPsへの分化の誘導

B-27サブリメント（Life technologies社製、カタログ番号：17504-044、2質量%）、EGF (R&D systems社製、カタログ番号：336-EG-200、20ng / mL)、bFGF (Wako社製、カタログ番号：064-04541、40ng / mL)、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、50U、50 μ g / mL）、及びCHIR99021 (cayman社製、カタログ番号：13122)を0～5 μ Mの濃度で含むD-MEM/F12培地（Life technologies社製、カタログ番号：10565-018）で前記iPS細胞由来神経堤幹細胞を培養した。3～5日間培養してヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞からSKPsへの分化を誘導し、SKPsへ分化した細胞を培養細胞分離／分散溶液（商品名：Accutase、BD Biosciences社製、カタログ番号：561527）を用いて継代培養し、B27 supplement (2質量%)、EGF (20ng / mL)、bFGF (40ng / mL)、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、50U、50 μ g / mL）を含
50

むD-MEM/F12培地でさらに培養した。

【0044】

10 このように培養して得られたSKPsについて、SKPsへ分化させる前のヒトiPS細胞からSKPsへの分化の様子を示す顕微鏡写真を図1に示す。なお、図1(A)はヒトiPS細胞の顕微鏡写真を示し、図1(B)はヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞の顕微鏡写真を示し、図1(C)はヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞をWntシグナルのアゴニスト(CHIR99021)を3μMで含有する分化誘導培地で培養することで得られたSKPsの顕微鏡写真を示し、図1(D)はヒトiPS由来神経堤幹細胞をWntシグナルのアゴニスト(CHIR99021)を3μMで含有する分化誘導培地で培養することで得られたSKPsを継代培養して得られた細胞の顕微鏡写真を示す(全て倍率:40倍)。

図1(A)に示すように、ヒトiPS細胞はコロニー状に増殖し、核の存在割合が高く細胞質が小さい。これに対し、図1(D)に示すように、継代培養後のSKPsはコロニー状ではなく、個別の細胞の状態で培養され、明瞭な細胞質の存在が認められる。従って、前記方法によりSKPsへ分化した細胞を継代培養することで、SKPsが増殖したことが確認された。

【0045】

次に、分化誘導を行う際のWntシグナルのアゴニスト(CHIR99021)の濃度を変えて培養し、ヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞から分化したSKPsの顕微鏡写真を図2に示す。なお、図2(A)はCHIR99021無添加(0μM)の培地で培養した場合、図2(B)はCHIR99021を0.1μMの濃度で添加した培地で培養した場合、図2(C)はCHIR99021を0.5μMの濃度で添加した培地で培養した場合、図2(D)はCHIR99021を3μMの濃度で添加した培地で培養した場合、図2(E)はCHIR99021を5μMの濃度で添加した培地で培養した場合に得られた細胞の顕微鏡写真を示す。ここで、P0は継代培養前の細胞の顕微鏡写真を示し、P1は継代培養後の細胞の顕微鏡写真を示す。

【0046】

図2に示すように、継代培養前であっても、CHIR99021を0.5~5μM濃度で添加した場合には、コロニーの辺縁部にSKPsへ分化した細胞がより多く遊走している様子が観察された。

なお、継代培養前の段階では未だ、SKPsに誘導された細胞以外の細胞も含まれている。そこで、SKPsの継代培養を選択的に行ったところ、CHIR99021を0.5~5μM濃度で添加した場合に、SKPsへ分化した細胞が選択的により多く増殖している様子が観察された。

従って、多能性幹細胞をWntシグナルのアゴニストを含有する分化誘導培地で培養することで、SKPsを効率よく大量に作製することができる事が確認された。

【0047】

試験例3 iPS細胞由来SKPsの同定(1)

前記試験例2で得られた分化誘導前のiPS細胞(以下、「iPS」ともいう)、iPS細胞由来神経堤幹細胞(以下、「iPS-NC」ともいう)、継代培養前のiPS細胞由来SKPs(以下、「iPS-SKPs-P0」ともいう)、及び継代培養後のiPS細胞由来SKPs(以下、「iPS-SKPs-P1」ともいう)について、下記表1に示す遺伝子の発現状況を下記表1に示す塩基配列のプライマーを用いてRT-PCR法に従って下記の方法により解析し、得られたSKPsの同定を行った。

【0048】

【表1】

表1

遺伝子	Sense Primer (5' -3')	Anti-Sense Primer (5' -3')
GAPDH	cggagtcaacggatttggtcg (配列番号 1)	agccttccatggtggtgaa (配列番号 2)
Oct-4	cgaagagaaaagcgaaccag (配列番号 3)	gtgaagtgagggctccata (配列番号 4)
Nanog	cagaaggcctcagcacctac (配列番号 5)	gcctccaagtcaactggcag (配列番号 6)
Nestin	cagcgttggaacagaggttg (配列番号 7)	gctggcacaggtgtctcaag (配列番号 8)
Snail	accgcctcgctgccaatgct (配列番号 9)	gtgcacatgttgggcaccca (配列番号 10)
Slug	catctttgggcgagtgagtcc (配列番号 11)	cccggtgtgagttctaattgtgtc (配列番号 12)
Dermo-1	gcaagaagtgcagcgaagatg (配列番号 13)	ggcaatggcagcatcattcag (配列番号 14)
Sox9	gtcagccaggtgctcaaagg (配列番号 15)	acttgtaatccgggtggtcc (配列番号 16)
BMP-4	ttctgcagatgttggctgc (配列番号 17)	agagccgaagctctgcagag (配列番号 18)
Wnt-5a	ggatggctggaagtgcattg (配列番号 19)	acacaaactggccacgatc (配列番号 20)
Versican	acgatgcctactttgccacc (配列番号 21)	tagtgaaacacaaccccatcc (配列番号 22)
CD133	atggccctcgtaactcggtc (配列番号 23)	cacgcggctgttaccacatag (配列番号 24)

10

20

30

【0049】

各サンプルからRNeasy Mini kit (QIAGEN社製、カタログ番号：74104) を用いてRNAを抽出した。抽出した各Total RNAの濃度を測定し、一定量のtotal RNA及びHigh capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems社製、カタログ番号：4387406) を用いて逆転写反応を行った。コントロールとして、Fetal Brain total RNA (Clontech社製、カタログ番号：636526) を用いて同様の操作を行った。

【0050】

このようにして得られたcDNAサンプル 1 μL を鋳型とし、前記プライマーを用いて 50 μL の系で PCR 反応を行った。ここで使用した酵素はKOD-Plus-Ver.2 (TOYOB0社製、カタログ番号：KOD-211) であり、94、2 min、(98、10秒；63、30秒；68、30秒) を1サイクルとした工程を 25 ~ 35 サイクルとする反応プロトコールで実施した。また、PCR 反応のポジティブコントロールとして、ヒト胎児脳由来RNA (Clontech社製、カタログ番号：636526) を鋳型として用いて同様にPCRを行った。

その後反応液 5 μL について 1.5 % アガロースゲル (タカラバイオ社製、カタログ番号：50071) / TBEバッファー (関東化学社製、カタログ番号：46510-78) を用いて 100 V で電気泳動した。GAPDHは実験全体のコントロールとして用いた。

【0051】

電気泳動の結果を図3 (A) 及び (B) に示す。ここで、図3 (A) はヒトiPS細胞の未分化状態の維持に重要な因子の発現変動を示し、図3 (B) はSKPsに特有の因子の発現を示す。

40

50

図3(A)に示すように、SKPsへの分化誘導に伴い、SKPsへ分化していない未分化な細胞に発現するマーカーの発現が減少した。さらに、図3(B)に示すように、SKPsへの分化誘導により、SKPsに特有の因子の発現が検出された。従って、前記方法により分化誘導した細胞がSKPsであることが確認された。さらに、iPS-SKPs-P0とiPS-SKPs-P1との間でSKPsに特有な因子の発現を比較したところ、Snail遺伝子、Slug遺伝子、Dermo-1遺伝子、Sox9遺伝子、及びCD133遺伝子について、iPS-SKPs-P0よりもiPS-SKPs-P1で発現が高い傾向が認められた(図3(B)参照)。ここで、図3(B)に示すように、内部標準であるGA-PDH遺伝子の発現はiPS-SKPs-P0とiPS-SKPs-P1との間で一定であることから、SKPsへ分化した細胞について継代培養を行うことで、SKPsに特有な因子を発現する細胞の割合が増加し、より純度の高い細胞集団としてSKPsが得られることを示している。

10

【0052】

試験例4 iPS細胞由来SKPsの同定(2)

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsについて、下記表2に示す抗体を用いて免疫組織蛍光染色を行い、ネスチン、SMA及びフィプロネクチンの発現状況を解析し、得られたSKPsの同定を行った。

【0053】

【表2】

表2

	目的タンパク	メーカー	詳細
一次抗体	Nestin	Millipore	MAB5326
	α -SMA	Sigma Aldrich	A2547
	fibronectin	Sigma Aldrich	F3648
二次抗体	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Life technologies	A11029
	Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Life technologies	A31572

20

【0054】

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsをD-PBS(-)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで15分間継代培養後のSKPsを固定した。固定した細胞をD-PBS(-)で洗浄後、Triton X-100のPBS溶液(濃度：0.5質量%)で5分間処理し、再びD-PBS(-)で洗浄後、10%ヤギ血清(ニチレイ社製、カタログ番号：426041)にて室温で1時間ブロッキングした。その後、前記表2に示す1次抗体(室温、2時間)及び2次抗体(室温、1時間)で処理し、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール(DAPI、DOJINDO社製、カタログ番号：FK045)で核を染色後、包埋し、SKPsに特有のマーカータンパク質(ネスチン、フィプロネクチン、-SMA)の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

30

【0055】

その結果を図4に示す。ここで、図4(A)はネスチンの発現を示す蛍光顕微鏡写真であり、図4(B)はフィプロネクチンの発現を示す蛍光顕微鏡写真であり、図4(C)は-SMAの発現を示す蛍光顕微鏡写真である(倍率：400倍)。

40

図4に示すように、ほぼ全ての細胞でSKPsに特有のマーカータンパク質の発現が認められた。これらの結果から前記試験例2で得られた細胞がSKPsであることが確認された。

【0056】

試験例5 iPS細胞由来SKPsの同定(3)

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsについて、フローサイトメトリー解析を行った。その結果を図5に示す。

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsをD-PBS(-)で洗浄した後、培養細胞分離/分散溶液(商品名:Accutase、BD Biosciences社製、カタログ番号：561527)で回収した。回収した細胞を 1×10^6 cells/100 μ Lのサンプルバッファー(商品名:BD Cyto fix Buffer、BD Biosciences社製、カタログ番号：554655)で室温、20分固定した。

50

細胞浸透洗浄溶液（商品名：BD Phosflow Perm/Wash buffer I、BD Biosciences社製、カタログ番号：557885）で洗浄後、同バッファーで室温、10分間細胞を処理した。その後、抗ネスチニン抗体（BD Pharmingen社製、カタログ番号：561231）、抗フィプロネクチン抗体（BD Pharmingen社製、カタログ番号：563100）及びアイソタイプコントロール（BD Biosciences社製、カタログ番号：347202、カタログ番号：557782）を1：20の比率で添加し、室温で30分間反応させた。細胞浸透洗浄溶液で2回洗浄し、500μLのPBSで懸濁し、懸濁液のフローサイトメトリー解析をBD FACSVerse（BD Biosciences社製）を用いて行った。

図5（A）は個々の細胞のSSCとFSCから、iPS細胞由来SKPsの細胞集団を検出し、解析する細胞集団（生細胞群）を選択した図を示す。図5（B）は、図5（A）で選択した細胞集団について抗ネスチニン抗体及び抗フィプロネクチン抗体での染色結果を示す。縦軸はネスチニンの発現強度（蛍光染色した蛍光強度）を示し、横軸はフィプロネクチンの発現強度（蛍光染色した蛍光強度）を示す。
10

【0057】

図5（B）に示す結果から、図5（B）のフローサイトメトリー解析に用いた全細胞数（図5（A）の選択領域の細胞数）に対する、ネスチニン及びフィプロネクチンを共に発現する細胞数の割合を算出した。その結果、98.46%の細胞がネスチニン及びフィプロネクチンを発現する（ネスチニン、フィプロネクチン共陽性）細胞であることが確認された。

従って、前記方法により分化誘導した細胞のうち、ほぼ全ての細胞がネスチニン及びフィプロネクチンを発現するSKPsであることが確認された。また、前記方法により得られた細胞の継代培養を行うことで、純度の高い細胞集団としてSKPsが得られることが確認された。
20

【0058】

試験例6 iPS細胞由来SKPsから脂肪細胞への分化の誘導

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsを 3×10^5 cells / 35mm dishで播種した。24時間培養後、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：I7018、0.45nM）、インスリン（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：I3536、2.07μM）、デキサメタゾン（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：D4902、100nM）、ウサギ血清（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：R4505、15%）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、100U、100μg / mL）を含むMEM培地（Life technologies社製、カタログ番号：42360-032）で2週間培養した。
30

その後、Oil Red O staining Kit（ScienCell research laboratories社製、カタログ番号：0843）を用い添付のプロトコールに従って、得られた細胞のOil Red O染色を行った。その結果を図6（A）に示す（倍率：200倍）。

【0059】

図6（A）に示すように、脂質が赤色に染色され、iPS細胞由来SKPsが脂肪細胞に分化したことが確認できた。従って、前記試験例2で得られた細胞が脂肪細胞に分化可能なSKPsであることが確認された。

【0060】

試験例7 iPS細胞由来SKPsから骨細胞への分化の誘導

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsを 3×10^5 cells / 35mm dishで播種した。24時間培養後、デキサメタゾン（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：D4902、100nM）、 α -glycerophosphate（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：G9422、10mM）、L-Ascorbic acid-2-phosphate（Sigma Aldrich社製、カタログ番号：A8960、50μM）、ウシ血清（Hyclone社製、カタログ番号：SH30070.03、10質量%）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、100U、100μg / mL）を含むMEM培地（Life technologies社製、カタログ番号：42360-032）で2週間培養した。

その後、Blue Alkaline Phosphatase substrate Kit（Vector laboratories社製

10

20

30

40

50

、カタログ番号：SK5300）を用い添付のプロトコールに従って、得られた細胞のアルカリ
フォスファターゼ染色を行った。その結果を図6（B）に示す（倍率：200倍）。

【 0 0 6 1 】

図6(B)に示すように、アルカリリフォスファターゼ陽性細胞が認められ、iPS細胞由来SKPsが骨細胞に分化したことが確認できた。従って、前記試験例2で得られた細胞が骨細胞に分化可能なSKPsであることが確認された。

【 0 0 6 2 】

試験例 8 スフェロイド培養による毛包誘導能の検討

市販のヒト正常表皮細胞（NHEK）（Life technologies社製）をEpiLife（商品名、Life technologies社製）で、市販のヒト正常毛乳頭細胞（Cell Applications社製）を毛乳頭増殖培地（TOYOB0社製）で37℃、5%CO₂条件下で継代培養した。また、市販の正常ヒト成人皮膚線維芽細胞（KURABO社製）を5質量%ウシ胎児血清（HyClone社製、カタログ番号：SH30070.03E）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Life technologies社製、カタログ番号：15140-122、50U、50μg/mL）を含むD-MEM培地（Life technologies社製、カタログ番号：11965-092）で継代培養した。また、SKPsとしては前記試験例2で得られた継代培養後のiPS細胞由来SKPs（iPS-SKPs-P1）を用いた。

[0 0 6 3]

各種細胞を継代培養した後、表皮細胞、線維芽細胞、毛乳頭細胞、iPS細胞由来SKPsをそれぞれ 4×10^4 cellsずつ混合し、96well非接着ラウンドボトムプレート（Cell Seed社製）にてAmnioMAX C-100培地（商品名、Life technologies社製）を用いて培養した。7日間培養後、得られたスフェロイドを凍結組織包埋剤（商品名：OCTコンパウンド、サクラファインテック社製）で包埋し、6 μm厚さの凍結切片を作製した。

作製した凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで15分間細胞を固定し、D-PBS(-)で洗浄後、10%ヤギ血清（ニチレイ社製、カタログ番号：426041）にて室温で1時間ブロッキングした。その後、抗トリコヒアリン抗体（Santa cruz社製 カタログ番号：sc-80607）を室温で2時間処理し、D-PBS(-)で洗浄後、2次抗体（Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)、Life technologies社製、カタログ番号：A11029）を室温で、1時間処理した。D-PBS(-)で洗浄後、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール（DAPI、DOJINDO社製、カタログ番号：FK045）で核を染色後、包埋し、トリコヒアリンの染色性を蛍光顕微鏡下で観察した。

[0 0 6 4]

その結果を図7に示す。ここで図7(A)は表皮細胞のみをスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。図7(B)は表皮細胞と線維芽細胞とを混合してスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。図7(C)は表皮細胞と毛乳頭細胞とを混合してスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。図7(D)は表皮細胞とiPS細胞由来SKPsとを混合してスフェロイド培養した細胞塊を抗トリコヒアリン抗体で免疫蛍光染色したときの蛍光顕微鏡写真を示す。なお、図中の矢印はトリコヒアリンの発現を示す。

図7(A)及び(B)に示すように、表皮細胞のみ又は表皮細胞と線維芽細胞の混合培養ではトリコヒアリンの発現は誘導されない。これに対し、図7(C)及び(D)に示すように、表皮細胞と、毛乳頭細胞又はiPS細胞由来SKPsとの混合培養ではトリコヒアリンの発現が誘導されたことが確認された。

したがって、前記試験例2で得られた細胞は毛乳頭細胞と同様に毛包誘導能を有することが確認された。

[0 0 6 5]

試験例9 iPS細胞由来SKPsからグリア細胞への分化の誘導

前記試験例2で得られた継代培養後のSKPsをSKPs培養用培地(2% B27 supplement (Life technologies社製、カタログ番号:17504-044)、20ng/mL EGF (R&D systems社製、カタログ番号:336-EG-200)、40ng/mL bFGF (Wako社製、カタログ番号:161-01040)に接種して、培養した。

番号 : 064-04541) 、 50 U ペニシリン、 50 μ g / mL ストレプトマイシン (Life technologies社製、カタログ番号 : 15140 - 122) を含むDMEM/F12培地 (Life technologies社製、カタログ番号 : 10565-018)) を用いて、事前に25倍希釈Laminin (Sigma Aldrich社製、カタログ番号 : P4707) 及び 0.1 mg / mL Poly-L-lysine (Sigma Aldrich社製、カタログ番号 : L4544) でコーティングした培養皿に 4.8×10^4 cells / 35 mm dishで播種した。24時間培養後、5 μ M Forskoline (Sigma Aldrich社製、カタログ番号 : F3917) 、 50 ng / mL Heregulin-1 (Peprotech社製、カタログ番号 : 100-03) 、 2% N2 supplement (Life technologies社製、カタログ番号 : 17502-048) 、 1% ウシ血清 (Hyclone社製、カタログ番号 : SH30070.03E) を含むDMEM : F12培地 (Life technologies社製、カタログ番号 : 10565-018) で 2 ~ 3 週間培養した。なお、培地交換は 2 ~ 3 日に 1 回行った。

得られた細胞をD-PBS(-)で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。固定した細胞をD-PBS(-)で洗浄後、0.5% Triton X-100のPBS溶液で 5 分間処理し、再びD-PBS(-)で洗浄後、10% ヤギ血清 (ニチレイ社製、カタログ番号 : 426041) にて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、1次抗体 (抗S100 抗体、Sigma Aldrich社製、カタログ番号 : S2532、室温、2時間) 、2次抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) 、Life technologies社製、カタログ番号 : A11029、室温、1時間) 処理した。その後、DAPI (DOJINDO社製、カタログ番号 : FK045) で核を染色後、包埋し、シュワン細胞に特有のマーカータンパク質 (S100) の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

【 0066 】

その結果を図 8 に示す。ここで図 8 (A) はヒト iPS 細胞から誘導した SKPs をさらにシュワン細胞へ 3 週間分化誘導した細胞の顕微鏡写真を示し、図 8 (B) は図 8 (A) の細胞に対し抗 S100 抗体を用いて染色した細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。

図 8 に示すように、S100 陽性細胞が認められ、iPS 細胞由来 SKPs がシュワン細胞に分化したことが確認できた。従って、前記試験例 2 で得られた細胞がシュワン細胞などのグリア細胞に分化可能な SKPs であることが確認された。

【 0067 】

上記試験例 3 ~ 9 に示すように、前記試験例 2 で得られた細胞が SKPs であることが確認された。したがって、本発明によれば、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、毛乳頭細胞などに分化可能な SKPs を効率よく大量に作製することができる。

【 0068 】

試験例 10 本発明により得られた iPS 細胞由来 SKPs の凍結保存

前記試験例 2 で得られた継代培養後の SKPs 1×10^6 cells をセルバンカー I (LSI メディエンス社製、カタログ番号 : 248085) 1 mL に懸濁し、-80° で凍結した。2 ~ 3 日経過後、緩慢法にて、凍結した細胞を液体窒素中に保存した。

保存した細胞を融解し、iPS 細胞由来 SKPs 培養用培地 (2% B27 supplement (Life technologies社製、カタログ番号 : 17504-044) 、 20 ng / mL EGF (R&D systems社製、カタログ番号 : 336-EG-200) 、 40 ng / mL bFGF (Wako社製、カタログ番号 : 064-04541) 、 50 U ペニシリン、 50 μ g / mL ストレプトマイシン (Life technologies社製、カタログ番号 : 15140 - 122) を含むDMEM/F12培地 (Life technologies社製、カタログ番号 : 10565-018)) で培養した。

【 0069 】

凍結保存前の SKPs 、及び融解後の SKPs の顕微鏡写真を図 9 に示す。なお、図 9 (A) は凍結保存前の SKPs の顕微鏡写真を示し、図 9 (B) は図 9 に示す SKPs の一部を緩慢法にて凍結保存後、融解し 1 日間培養後の細胞の顕微鏡写真を示し、図 9 (C) は図 9 (B) に示す細胞をさらに 3 日間増殖培養した細胞の顕微鏡写真を示す。

図 9 に示すように、SKPs は凍結融解を行っても、細胞増殖し、培養が継続できることが確認された。したがって、本発明で得られる SKPs は凍結保存、継代培養が可能であることが示された。

【 0070 】

10

20

30

40

50

試験例 11　凍結融解後のiPS細胞由来SKPsの脂肪細胞への分化の誘導

試験例10で得られた、図9(A)に示す凍結保存前のSKPs及び図9(C)に示す凍結融解後のiPS細胞由来SKPsそれぞれに対して、試験例6と同様の方法で脂肪細胞への分化の誘導を行った。その結果を図10に示す。ここで、図10(A)は凍結保存前のSKPsをさらに脂肪細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、Oil Red O染色を行った脂肪細胞の顕微鏡写真を示し、図10(B)は凍結融解後のSKPsを培養し、さらに脂肪細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、Oil Red O染色を行った脂肪細胞の顕微鏡写真を示す。

図10に示すように、凍結保存前のSKPsと同様に凍結融解増殖培養後のSKPsも脂質が赤色に染色され、脂肪細胞に分化したことが確認できた。従って、前記試験例2で得られた細胞は継代、凍結保存をしても脂肪細胞への分化誘導能を保持していることが示された。
10

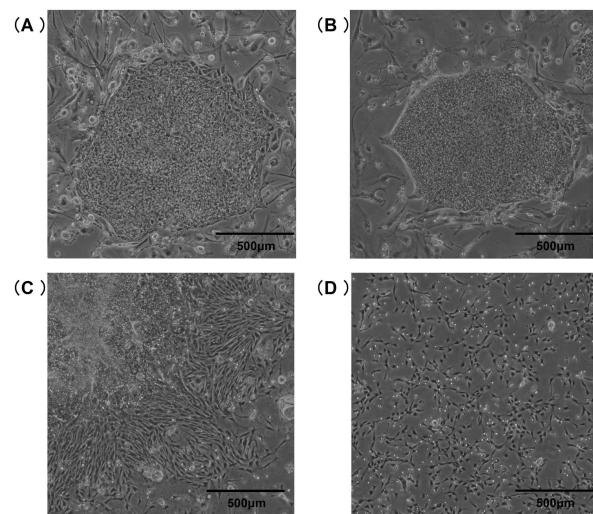
【0071】

試験例12　凍結融解後のiPS細胞由来SKPsの骨細胞への分化の誘導

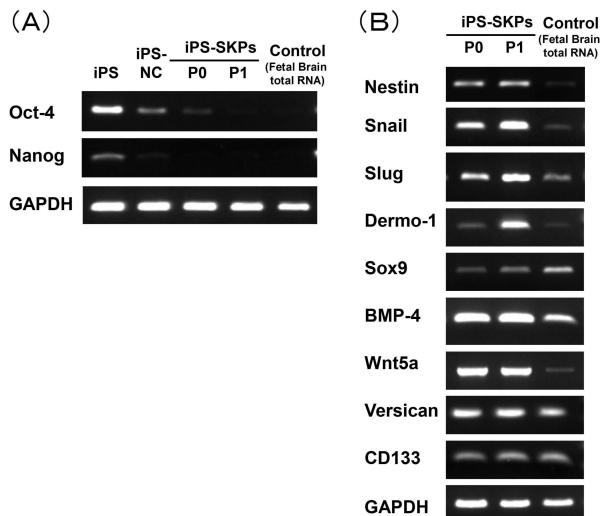
試験例10で得られた、図9(A)に示す凍結保存前のSKPs及び図9(C)に示す凍結融解後のiPS細胞由来SKPsそれぞれに対して、試験例7と同様の方法で骨細胞への分化の誘導を行った。その結果を図11に示す。ここで、図11(A)は凍結保存前のSKPsをさらに骨細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、アルカリフィオスファターゼ染色を行った骨細胞の顕微鏡写真を示し、図11(B)は凍結融解後のSKPsを培養し、さらに骨細胞へ2週間分化誘導した細胞に対し、アルカリフィオスファターゼ染色を行った骨細胞の顕微鏡写真を示す。

図11に示すように、凍結保存前のSKPsと同様に凍結融解増殖培養後のSKPsもアルカリフィオスファターゼ陽性細胞が認められ、骨細胞に分化したことが確認できた。従って、前記試験例2で得られた細胞は継代、凍結保存をしても骨細胞への分化誘導能を保持していることが示された。
20

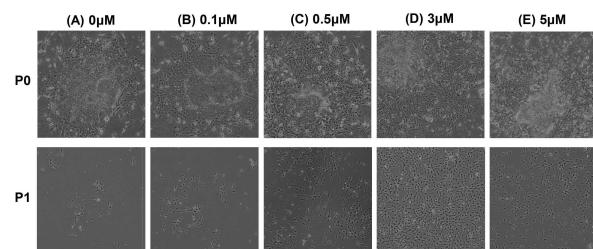
【図1】



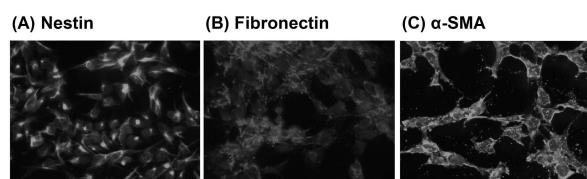
【図3】



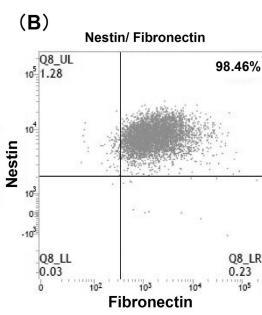
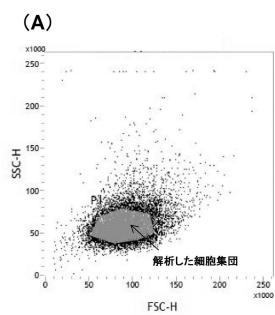
【図2】



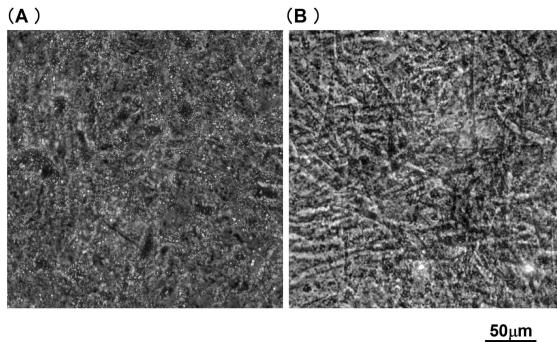
【図4】



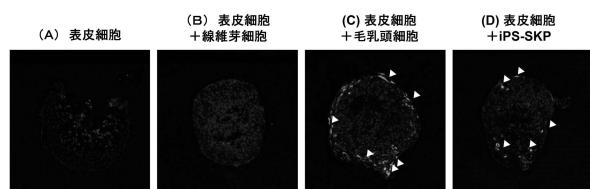
【図5】



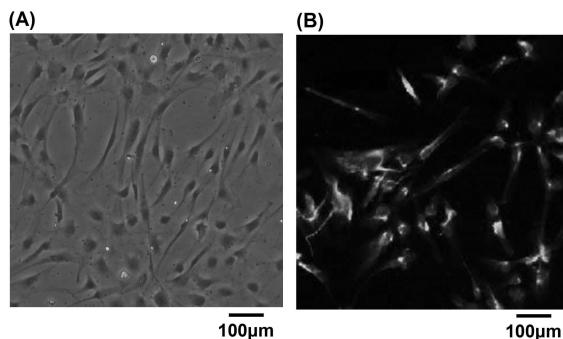
【図6】



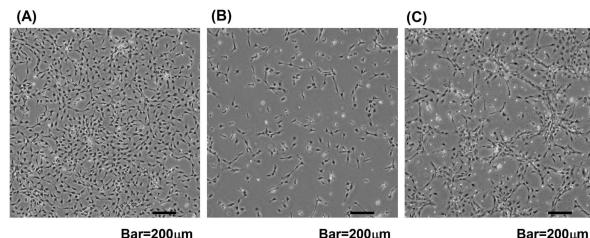
【図7】



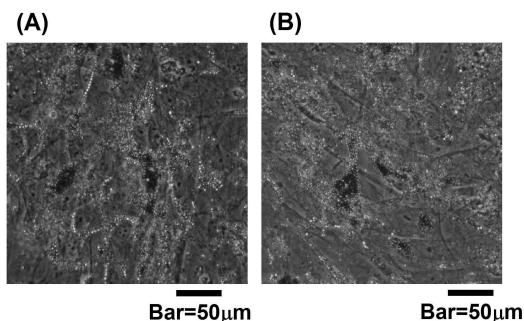
【図8】



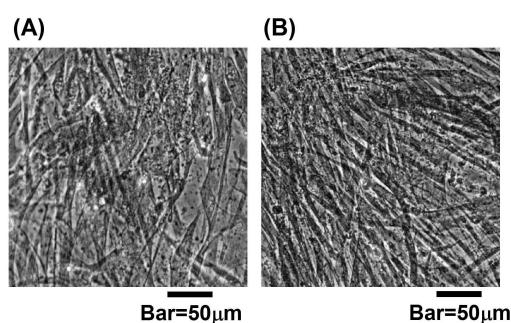
【図9】



【図10】



【図11】



【配列表】

0006304818000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2013/051722 (WO, A1)
国際公開第2007/016485 (WO, A1)
国際公開第2005/071063 (WO, A1)
国際公開第2010/011352 (WO, A1)
PLoS One, 2012, Vol.7, No.11, e50742, pp.1-10
Nature Protocols, 2010, Vol.5, No.4, pp.688-701

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 5 / 00
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d