

(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
2022年9月15日(15.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/191171 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/073 (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/009925
- (22) 国際出願日: 2022年3月8日(08.03.2022)
- (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 2021-037339 2021年3月9日(09.03.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 Tokyo (JP). 武田薬品工業株式会社(TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 武部 貴則 (TAKEBE Takanori); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 佐伯 憲和(SAIKI Norikazu); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (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, IT, JM, 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,

(54) Title: CELL CLUSTER PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 細胞クラスターの製造方法

(57) Abstract: With regard to a cell cluster formed from a colony of pluripotent stem cells, such as iPS cells, by a differentiation-inducing factor, the present invention provides a method which serves as a means for enriching desired cells that are included in the micropattern structure specific to the embryonic region, in particular germ layer cells in yolk sac or amniotic ectoderm cells. This method is for producing a cell cluster including desired cells that have been enriched from pluripotent stem cells, and the method includes a step for two-dimensionally culturing pluripotent stem cells with Wnt signaling being activated. Examples of this method include: a method for producing a cell cluster including germ layer cells in yolk sac that have been enriched from pluripotent stem cells, the method including a step for two-dimensionally culturing pluripotent cells under a condition of Wnt signaling activation; and a method for producing a cell cluster including amniotic ectoderm cells that have been enriched from pluripotent stem cells, the method including a step for two-dimensionally culturing pluripotent cells under a condition of Wnt signaling suppression.

(57) 要約: 本発明は、iPS細胞等の多能性幹細胞のコロニーから分化誘導因子によって形成される細胞クラスターにおいて、胚発生領域特異的なマイクロパターン構造に含まれる所望の細胞、特に卵黄嚢中胚葉細胞または羊膜外胚葉細胞を富化するための手段として、以下の方法を提供する。Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程を含む、多能性幹細胞から所望の細胞が富化された細胞クラスターを製造する方法。例えば、Wntシグナルを活性化する条件下で多能性幹細胞を二次元培養する工程を含む、多能性幹細胞から卵黄嚢中胚葉細胞が富化された細胞クラスターを製造する方法、および、Wntシグナルが抑制された条件下で多能性幹細胞を二次元培養する工程を含む、多能性幹細胞から羊膜外胚葉細胞が富化された細胞クラスターを製造する方法。

WO 2022/191171 A1

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).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：細胞クラスターの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞のコロニーから、分化誘導因子によって形成される、胚発生領域特異的なマイクロパターンを有する細胞クラスターであって、所望の細胞が富化された細胞クラスターの製造方法に関する。また、その細胞クラスター中の細胞がさらに分化することで生成する細胞集団の製造方法、その細胞クラスター中の細胞または細胞集団中の細胞をさらに培養することにより形成されるオルガノイドまたは立体臓器に関する。

背景技術

[0002] E S細胞、i P S細胞などの多能性幹細胞は、発生学上の定義でいうエピブラスト (epiblast、胚盤葉上層) に該当し、多能性幹細胞のコロニーからは、分化誘導因子によって、胚発生領域特異的なマイクロパターンを有する細胞クラスターが形成されることが知られている。例えば、非特許文献1には、ヒトE S細胞を二次元培養すると、BMP 4シグナルによって三胚葉 (内胚葉、中胚葉および外胚葉) を含むマイクロパターンを形成したことが記載されている。また、非特許文献2には、ヒトE S細胞からマイクロパターンを形成した後、W n tシグナルを阻害することにより、内胚葉および中胚葉への分化を制御したことが記載されている。非特許文献3には、マウスE S細胞からマイクロパターンを形成した場合、卵黄囊中胚葉細胞も低い割合ながら出現したことが記載されている。

[0003] 一方、中胚葉細胞からはさらに、血管内皮細胞などが分化する。例えば、特許文献1には、気液界面培養により階層的な細胞ネットワーク (例、血管や神経のネットワーク) を形成させたマトリックス組成物の製造方法が記載されており、その細胞ネットワークの形成のために、脈管細胞として血管内皮細胞を用いることが記載されている。特許文献1の実施例には、BMP 4、VEGF、CHIR 99021などを含む培地を用いた培養によりヒトi

P S細胞から側板中胚葉系細胞を誘導し、培地の交換後のさらなる培養により造血性血管内皮細胞（C D 3 4 陽性、C D 7 3 陰性）を得たことや、そのようにして得られた造血性血管内皮細胞を含む複数の種類の細胞を用いて、階層的な細胞ネットワークを形成させたマトリックス組成物を製造したことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1 : W02020/203713

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Warmflash et al., NATURE METHOD VOL.11 No.8 August 2014

非特許文献2 : Martyn et al., Development(2019) 146, dev17291

非特許文献3 : Morgani et al., eLife 2018 ;7 :e32839

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 多能性幹細胞のコロニーから分化誘導因子によって形成される細胞クラスターにおいて、胚発生領域特異的なマイクロパターン構造に含まれる特定の細胞の比率を調節する方法、例えば特定の細胞を富化し、その細胞から分化する目的細胞を効率的に得られるようにする方法は、これまで知られていない。

[0007] 本発明は、多能性幹細胞から形成される細胞クラスターに含まれる所望の細胞、特に卵黄嚢中胚葉細胞 (yolk sac mesoderm cell、本明細書において「Y S M C」と標記する場合がある。) または羊膜外胚葉細胞 (amniotic ectoderm cell、本明細書において「A E C」と標記する場合がある。) を富化するための手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、W n t シグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養することにより、細胞クラスター中の所望の細胞を富化することができること、例

例えば、多能性幹細胞の培養開始時にW n tシグナル活性化剤を培地に添加するなど、W n tシグナルを活性化する条件下で多能性幹細胞を二次元培養することにより、Y S M Cが富化された細胞クラスターを製造できること、逆に多能性幹細胞の培養開始時にW n tシグナル阻害剤を培地に添加するなど、W n tシグナルが抑制された条件化で多能性幹細胞を二次元培養することにより、A E Cが富化された細胞クラスターを製造できることなどを見出した。細胞クラスターの一つの局面では、Y S M CやA E Cなどの所望の細胞とそれ以外の細胞とが、二次元的な位置関係と境界を保ちながら層状構造を形成しており、所望の細胞を含む層の厚みを増やすことができるということも重要な特徴である。

[0009] すなわち、本発明は少なくとも下記の事項を含む。

[1]

多能性幹細胞から所望の細胞が富化された細胞クラスターを製造する方法であり、W n tシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程を含む、方法。

[2]

前記所望の細胞が、卵黄囊中胚葉細胞であり、前記W n tシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程が、W n tシグナルを活性化する条件下で多能性幹細胞を二次元培養する、W n tシグナル活性化培養工程である、[1]に記載の方法。

[3]

前記W n tシグナル活性化培養工程が、W n tシグナル活性化剤を添加した培地を用いて多能性幹細胞を二次元培養する工程である、[2]に記載の方法。

[4]

前記W n tシグナル活性化剤がG S K 3阻害剤である、[3]に記載の方法。

[4 a]

前記GSK3阻害剤がCHIR99021である、[4]に記載の方法。

[5]

前記Wntシグナル活性化培養工程が、前記多能性幹細胞の培養開始時に行われる、[2]に記載の方法。

[6]

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、[1]に記載の方法。

[7]

[2]に記載のWntシグナル活性化培養工程の後、得られた前記卵黄囊中胚葉細胞からCD34+血管内皮前駆細胞に分化させる培養工程をさらに含む、細胞集団の製造方法。

[8]

前記CD34+血管内皮前駆細胞から、CD34+CD32+卵黄静脈造血性内皮細胞に分化させる培養工程をさらに含む、[7]に記載の方法。

[9]

[1]に記載の方法により得られた細胞クラスター。

[10]

[7]に記載の方法により得られた細胞集団。

[11]

[9]に記載の細胞クラスターまたは[10]に記載の細胞集団の少なくとも一部を三次元培養する工程を含む、オルガノイドまたは立体臓器の製造方法。

[12]

[11]に記載の製造方法により得られた、オルガノイドまたは立体臓器。

[13]

前記所望の細胞が、羊膜外胚葉細胞であり、前記Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程が、Wntシグナルが抑制された条件下で多能性幹細胞を二次元培養する、Wntシグナル抑制培養工程である、[

1]に記載の方法。

[14]

前記Wntシグナル抑制培養工程が、Wntシグナル阻害剤を添加した培地を用いて行われる、[13]に記載の方法。

[15]

前記Wntシグナル阻害剤がIWP-2である、[14]に記載の方法。

発明の効果

[0010] 本発明に従い、Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養することにより、多能性幹細胞から所望の細胞が富化された細胞クラスターを製造すること、特に、Wntシグナル活性化培養工程によりYSMCが富化された細胞クラスターを製造すること、およびWntシグナル抑制培養工程によりAECが富化された細胞クラスターを製造することができる。さらに、YSMCが富化された細胞クラスターからは、例えばオルガノイドまたは立体臓器の製造に利用することができる、CD34+血管内皮前駆細胞を効率的に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例の[1]「Wntシグナル活性化培養工程によるヒト卵黄嚢中胚葉細胞の作製（本発明の第1実施形態）」および[3]「免疫細胞染色による細胞集団の分化マーカー解析」に関する。「+CHIR」はCHIR99021（Wntシグナル活性化剤）を培地に添加した場合、「(-)」は対照としてCHIR99021を添加しなかった場合を示す。[図1A]光学顕微鏡による観察像。右上段が、Wntシグナル活性化条件（Wntシグナル活性化剤を培地に添加）下におけるヒトiPS細胞の培養開始後2日目の画像であり、右下段が対照としてWntシグナルを活性化しない条件（Wntシグナル活性化剤を培地に添加しない）下におけるヒトiPS細胞の培養開始後2日目の画像である。[図1B]BrachyuryおよびGATA6の蛍光画像。カラー画像では、細胞クラスターの中央部はBrachyuryの発現を示す緑色で染色され、外縁部はGATA6の発現を示す紫色で染色されている。[図1C]+CHIR、(-)それぞれの蛍光画像における、Brachyury、

GATA6およびFOXF1それぞれの蛍光強度（グレースケールに換算した場合）と、中心からの距離の関係を示すグラフ。

[図2]図2は、実施例の[2]「Wntシグナル阻害培養工程によるヒト羊膜外胚葉細胞の作製（本発明の第2実施形態）」および[3]「免疫細胞染色による細胞集団の分化マーカー解析」に関する。「+IWP-2」はIWP-2（Wntシグナル阻害剤）を培地に添加した場合、「(-)」は対照としてIWP-2を培地に添加しなかった場合、「+CHIR」は参考としてIWP-2の代わりに本発明の第1実施形態で用いたCHIR99021を培地に添加した場合を示す。上段：DAPIおよびGATA6の蛍光画像。カラー画像では、細胞クラスターの中央部はDAPIにより青色で染色され、外縁部はGATA6の発現を示す赤色で染色されている。中段：SOX2およびCDX2の蛍光画像。カラー画像では、細胞クラスターの中央部はSOX2の発現を示すシアン色で染色され、外縁部はCDX2の発現を示すピンク色で染色されている。下段：TFAP2AおよびSOX2の蛍光画像。カラー画像では、細胞クラスターの中央部はSOX2の発現を示すシアン色で染色され、外縁部はTFAP2Aの発現を示す橙色で染色されている（主に+IWP-2）。

[図3]図3は、実施例の[4]「ヒト卵黄静脈造血性内皮細胞の作製」、[5]免疫細胞染色による細胞集団の分化マーカー解析および[6]「フローサイトメトリーを用いた分化マーカー解析」に関する。「+CHIR」はCHIR99021（Wntシグナル活性化剤）を培地に添加して得られた細胞クラスターから分化誘導した場合であり、「(-)」は対照としてCHIR99021を添加せずに得られた細胞クラスターから分化誘導した場合である。[図3A] BrachyuryおよびCD34の蛍光画像。カラー画像では、右側（+CHIR）の細胞集団は、Brachyuryの発現を示す緑色の中央部の領域は比較的小さく、CD34の発現を示す赤色の外縁部の領域が比較的大きく広がっているのに対し、左側（-）の細胞集団は、Brachyuryの発現を示す緑色の中央部の領域が比較的大きく、外縁部は、GATA6と、中央部より低いBrachyuryの発現を示す橙色で染色されている。[図3B] CD34およびCD32の発現に基づくフローサイトメトリーの解析結果。

発明を実施するための形態

[0012] ー細胞クラスターの製造方法ー

本発明の細胞クラスターの製造方法は、多能性幹細胞から所望の細胞が富化された細胞クラスターを製造する方法であり、Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程を含む。本発明の細胞クラスターの製造方法は、代表的には下記の2つの実施形態、第1実施形態および第2実施形態を包含する。

[0013] 本明細書において、所望の細胞が「富化された (enriched)」とは、細胞クラスター中の所望の細胞の量、または全細胞の量に対する所望の細胞の量の比率が、富化される前の細胞クラスター、または本発明を実施せずに (Wntシグナルを調節しない条件下で) 得られた細胞クラスターのような対照における量または比率と比較して、増加していることを指す。逆の表現として、所望の細胞を「富化する (enrich)」及び「富化すること (enrichment)」とは、細胞クラスター中の所望の細胞の量、または全細胞の量に対する所望の細胞の量の比率を、対照における量または比率と比較して、増加させることを指す。本発明の特定の実施形態では、本発明により製造される細胞クラスター中の所望の細胞の量または比率は、対照の細胞クラスター中の量または比率と比較して、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%増加するよう、富化される。

[0014] 本明細書において、多能性幹細胞を「二次元培養」するとは、多能性幹細胞をフィーダーフリーで接着培養することを指す。iPS細胞、ES細胞などの多能性幹細胞を二次元培養する (フィーダーフリーで接着培養する) ための培養方法は公知である。例えば、ヒトES/iPS細胞をフィーダーフリーで培養する方法は、Rodin S et al., Nat Biotechnol. (2010) 28(6):611-5、Chen et al., Nat Methods (2011) 8(5):424-429、Miyazaki, T. et al. Nat Commun (2012) 3, 1236、Okita et al., Stem Cells, (2013) 31(3):458-66、およびNakagawa M et al., Scientific Reports, (2014) 4:3594に記載されている。

[0015] 本明細書において「細胞クラスター」とは、多能性幹細胞のコロニーから形成される、胚発生領域特異的なマイクロパターンを有する細胞の集合体を指す。「コロニー」とは、固型培地で1個の細胞から出発してできた可視的な集塊を指し、「多能性幹細胞のコロニー」とは、1個の多能性幹細胞が未分化性を維持しながら自己複製し、複製された細胞と細胞が接着して増えてできた可視的な細胞集合体を指す。また、「マイクロパターン」とは、異なる細胞種がランダムではなく、一定の規則に従って配列した状態（規則は自然に生まれたものでも人工的にデザインされてものでもよい）を指し、「胚発生領域特異的なマイクロパターン」とは、細胞集合体が放射形対称を維持しながら複数種の細胞に分化することで形成された、生体胚形成における細胞分化パターンと部分的に近似する幾何学的配置を指す。多能性幹細胞のコロニーからそのような細胞クラスターを形成するための手段、例えば培地に添加する分化誘導因子は公知である（例えば、前掲非特許文献1～3参照）。本発明においても、以下に記載する第1実施形態および第2実施形態ともに、従来と同様の分化誘導因子を用いることができる。そのような分化誘導因子としては、例えば、BMP4、TGF β 、bFGF、VEGFが挙げられ、特にBMP4およびVEGFを用いることが好ましい。

[0016] 分化誘導因子の使用量は特に限定されるものではなく、Wntシグナル活性化培養工程やWntシグナル抑制培養工程における分化誘導因子の種類や、分化誘導因子同士または分化誘導因子と培地の組み合わせなどに応じて、所定のマイクロパターンを有する細胞クラスターが形成されるよう、また本発明においては特に、Wntシグナル活性化剤またはWntシグナル抑制剤をさらに添加したときに所望の細胞が富化された細胞クラスターが製造可能であるように、当業者であれば適宜調節することができる。BMP4の培地中の濃度は、例えば10～100 μ M、好ましくは50～80 μ Mの範囲内とすることができる。TGF β の培地中の濃度は、例えば2～20 μ M、好ましくは2～10 μ Mの範囲内とすることができる。bFGFの培地中の濃度は、例えば10～100 μ M、好ましくは50～80 μ Mの範囲内とする

ことができる。VEGFの培地中の濃度は、例えば5～100 μ M、好ましくは50～80 μ Mの範囲内とすることができる。

[0017] Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する際に用いる「培地」は、以下に記載する第1実施形態ではWntシグナル活性化剤をさらに添加してもよいこと、また第2実施形態ではWntシグナル抑制剤をさらに添加してもよいこと以外は、多能性幹細胞の二次元培養に用いられている一般的な培地、特に多能性幹細胞の二次元培養により胚発生領域特異的なマイクロパターンを有する細胞クラスターを形成するために用いられている公知の培地と、基本的に同じものとするすることができる。当業者であれば、培養する多能性幹細胞に応じて、適切な種類および量の基礎培地および必要に応じて用いられる添加物を選択し、それらを混合することにより、適切な培地を調製することができる。

[0018] iPS細胞、ES細胞などの多能性幹細胞のための培地としては、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）や、市販の培養液、例えば、マウスES細胞培養用培養液（TX-WES培養液、トロンボX社）、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTESR、Stemcell Technology社）、iPS/ES細胞増殖用培地／再生医療用培地（StemFit（登録商標）AK02N、Ajinomoto Healthy Supply Co., Inc.）、iPS細胞培養用フィーダーフリー培地（Essential 8、Gibco）が挙げられ、無血清培地を用いることも可能である（例、Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci USA, 106:15720-15725）。

[0019] 培養容器は特に限定されるものではなく、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、商品名「OptiCell」（Nunc社）等の細胞培養シートなどを用いることができる。培養容器は、細胞との接着性（親水性）を向上させるための表面処理や、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラ

ミニン、フィブロネクチン、マトリゲル（例、BDマトリゲル（日本ベクトン・デッキンソン社））、ビトロネクチンなどの細胞接着用基質でコーティングされていることが好ましい。

[0020] ・第1実施形態／Wntシグナル活性化培養工程

第1実施形態は、「所望の細胞」として「卵黄囊中胚葉細胞」（YSMC）が富化された細胞クラスターを製造する方法であって、「Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程」として、「Wntシグナルを活性化する条件下で多能性幹細胞を二次元培養する工程」（Wntシグナル活性化培養工程）を行う実施形態である。

[0021] YSMCは、胚外にある発生初期の造血器官である卵黄囊において、血島を形成する血球と血管構造を構成する細胞へ分化する細胞であり、細胞マーカーとして、GATA6陽性かつBrachyury陰性（GATA6+Brachyury⁻）の細胞として特定することができ、他にFOXF1、GATA3、GATA4、フィブロネクチン（FN1）、コラーゲン（例、COL1A1、COL1A2、COL3A1、COL4A1、COL6A1、COL6A3）、ラミニン-111（例、LAMA1、LAMB1、LAMC1）、KDRおよびHAND1等も陽性であり得る。細胞クラスターにおいてYSMCが富化されているか否か、またどの程度富化されているかは、例えば、そのような細胞マーカーを標的とした免疫染色により得られる蛍光画像を解析し、対照と比較することによって、定量的または定性的に評価または判定することができる。

[0022] Wntシグナル活性化培養工程は、多能性幹細胞から所定のマイクロパターンを有する細胞クラスターへの分化誘導のための培養開始時（培養初期）に、より具体的には、多能性幹細胞から胚体外胚葉（embryonic ectoderm）および原始線条（primitive streak）を含む胚体エピブラスト（embryonic epiblast）と胚外外胚葉（extraembryonic ectoderm）に分化が分かれる前に、行うことが適切である。例えば、所定の分化誘導因子が添加された培地中でiPS細胞（のコロニー）を培養する分化誘導の開始から起算して0日目

から2日目 (Day 0~Day 2) に、Wntシグナルを活性化する条件下でiPS細胞を培養すること、すなわちWntシグナル活性化培養工程を行うことが好ましい。より具体的には、Day 0に、Wntシグナル活性化剤を(所定の分化誘導因子と共に)培地に添加し、その培地中でiPS細胞等の多能性幹細胞を培養することが好ましい。なお、そのような実施形態において、Day 1の培地および/またはDay 2の培地にもWntシグナル活性化剤を添加することは、必須ではない。

[0023] 「Wntシグナルを活性化する条件」は、YSMCが富化された細胞クラスターが得られるという本発明の作用効果が奏されるのであれば、特に限定されるものではなく、公知の手段を利用することができる。典型的には、Wntシグナルを活性化する作用を有する種類および量の物質、すなわち「Wntシグナル活性化剤」を培地に添加することが、Wntシグナルを活性化する条件として挙げられる。

[0024] Wntシグナル活性化剤の種類は特に限定されるものではないが、例えば、GSK3阻害剤が好ましい。GSK3阻害剤としては、例えばCHIR99021、SB-216763、BI0(6-bromoindirubin-3'-oxime)、LY2090314などの化合物が挙げられる。Wntシグナル活性化剤としては、GSK3阻害剤以外にも、例えば、SFRP阻害剤(例、WAY-316606)、Notum阻害剤(例、ABC99)、PP2A活性化剤(例、IQ1)、ARFGAP1活性化剤(例、QS11)、 β カテニン活性化剤(例、DCA)、(ヘテロ)アリールピリミジン、2-アミノ-4-[3,4-(メチレンジオキシ)ベンジル-アミノ]-6-(3-メトキシフェニル)ピリミジンなどの化合物が挙げられる。本発明の方法においては、2以上、例えば2、3、または4種類のWntシグナル活性化剤を併用してもよい。

[0025] Wntシグナル活性化剤の使用量は特に限定されるものではなく、Wntシグナル活性化剤の種類に応じて、所望の程度の作用効果が奏されるよう、つまり細胞クラスター中のYSMCが所望の程度に富化されるよう、適宜調節することができる。例えば、Wntシグナル活性化剤としてGSK3阻害

剤（CHIR99021など）を用いる場合、GSK3阻害剤の培地中の濃度は、例えば0.5～3 μ M、好ましくは1～2 μ Mの範囲内とすることができる。

[0026] なお、iPS細胞等を培養するために慣用されている（エピブラストからほぼ全ての分化細胞誘導に必須である）成長因子BMP4は、Wntシグナルと関係することが知られているが、iPS細胞等の培養に用いるための一般的な量、すなわちYSMCの富化という本発明の第1実施形態の作用効果が認められない量で用いられる（例えば、後記実施例における対照のように用いられる）場合のBMP4は、第1実施形態におけるWntシグナル活性化剤とはみなさないこととする。言い換えれば、本発明におけるWntシグナル活性化剤は、仮にBMP4が一般的な量で培地中に存在する場合であっても、それによらずに単独でYSMCの富化という本発明の第1実施形態の作用効果を有するものと（対照と比較すること等により）認められる、BMP4以外の種類および量の物質を指す。

[0027] ・第2実施形態／Wntシグナル抑制培養工程

第2実施形態は、「所望の細胞」として「羊膜外胚葉細胞」（amniotic ectoderm cell：AEC）が富化された細胞クラスターを製造する方法であって、「Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程」として、「Wntシグナルが抑制された条件下で多能性幹細胞を二次元培養する工程」（Wntシグナル抑制培養工程）を行う実施形態である。

[0028] AECは、胎児胚を覆う、羊膜上皮細胞へ分化する外胚葉系細胞である。AECの細胞マーカーとしては、CDX2、TFAP2A、GATA3、TFAP2B、E-カドヘリンなどが知られており、それらの1種または2種以上が陽性であるかどうかにより特定することができる（陽性であればAEC、陰性であればAEC以外）。また、上記細胞マーカー（陽性マーカー）と組み合わせて、未分化細胞や胚体外胚葉の細胞マーカーであるNANOG、SOX2などの1種または2種以上が陰性であるかどうか、AECを特定するために利用することができる（陰性であればAEC、陽性であれば未分化細胞または外胚葉）。細胞クラスターにおいてAECが富化されている

かは、例えば、そのような細胞マーカーを標的とした免疫染色により得られる蛍光画像を解析し、対照と比較することによって、定量的または定性的に評価または判定することができる。

[0029] 「Wntシグナルが抑制された条件」は、AECが富化された細胞クラスターが得られるという本発明の作用効果が奏されるのであれば、特に限定されるものではなく、公知の手段を利用することができる。典型的には、Wntシグナルを抑制する作用を有する種類および量の物質、すなわち「Wntシグナル抑制剤」を培地に添加することが、Wntシグナルを抑制する条件として挙げられる。

[0030] Wntシグナル抑制剤の種類は特に限定されるものではないが、例えば、Porcupine（ポルクピン、PORCN）阻害剤が好ましい。Porcupine阻害剤としては、例えばIWP-2、LGK974、Wnt-C59、ETC-159、IWP-01、IWP L6、GNF-6231、Porcn-IN-1などの化合物が挙げられる。Wntシグナル抑制剤には、Porcupine阻害剤以外にも、例えば、（膜結合性でない）遊離Wnt阻害剤（例、Ant1.4Br/Ant 1.4Cl）、Frizzled阻害剤（例、Niclosamide）、Vacuolar ATPase阻害剤（例、apicularen and bafilomycin）、tankyrase 1/Axin活性化剤（例、XAV939）、Axin活性化剤（例、IWR）、tankyrase, Axin活性化剤（例、G007-LKおよびG244-LM）、CK1阻害剤（例、pyrvinium）、Dsh阻害剤（例、NSC668036）、TCF/ β カテニン阻害剤（例、2, 4-ジアミノキナゾリン、PKF115-584）、TCF阻害剤（例、ケルセチン）、CREB結合タンパク質阻害剤（例、ICG-001）、 β カテニンTBL相互作用阻害剤（例、BC2059）、Shizokaol Dなどの化合物が挙げられる。本発明の方法においては、2以上、例えば2、3、または4種類のWntシグナル抑制剤を併用してもよい。

[0031] Wntシグナル抑制剤の使用量は特に限定されるものではなく、Wntシグナル抑制剤の種類に応じて、所望の程度の作用効果が奏されるよう、つまり細胞クラスター中のAECが所望の程度に富化されるよう、適宜調節することができる。例えば、Wntシグナル抑制剤としてPorcupine阻

害剤（IWP-2など）を用いる場合、培地中のPorcupine阻害剤の濃度は、例えば0.5～2 μM、好ましくは0.5～1 μMの範囲内とすることができる。

[0032] なお、本発明の第2実施形態においても、iPS細胞等の培養に用いるための一般的な量でBMP4を培地に添加することができるが、本発明におけるWntシグナル抑制剤は、そのような場合であっても、AECの富化という本発明の第2実施形態の作用効果を有するものと（対照と比較すること等により）認められる種類および量の物質を指す。

[0033] ・ 所望の細胞以外の細胞

本発明の細胞クラスターの製造方法により得られる細胞クラスターは、YSMCやAECなどの所望の細胞以外の細胞（本明細書において「非所望細胞」と呼ぶ。）を含むことができる。非所望細胞としては、公知のマイクロパターンに含まれる、YSMCおよびAEC以外の細胞、例えば、SOX2陽性胚体外胚葉や、T（Brachyury）陽性細胞（primitive streak）ならびにこれに由来する胚体中胚葉および胚体内胚葉などが挙げられる。本発明の製造方法により得られる細胞クラスターは、一つの局面では、YSMCやAECなどの所望の細胞と非所望細胞とが、二次元的な位置関係と境界を保ちながら層状構造を形成しており、所望の細胞を含む層の厚みを増やすことができるということも本発明の特徴の一つである。

[0034] ー 細胞集団の製造方法 ー

本発明の細胞集団の製造方法は、細胞クラスターの製造方法の第1実施形態に従ったWntシグナル活性化培養工程の後、得られた卵黄囊中胚葉細胞（YSMC）からCD34+血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell：EPC）に分化させる培養工程（EPC分化工程）をさらに含み、必要に応じてその他の工程をさらに含むこともできる方法である。

[0035] 本明細書において、特に製造方法との関係で言及される「細胞集団」は、前述した「細胞クラスター」が形成された後、さらに培養することで、所望の細胞（YSMC、AECなど）から分化した細胞が含まれることとなった

細胞の集合体を指す。

[0036] EPCは、CD34陽性細胞として特定することができ、血管内皮細胞 (endothelial cell: EC) への分化能を有する細胞である。EPCから分化するECには、例えば、後述する卵黄静脈造血性内皮細胞 (vitelline venous hemogenic endothelial cell: VVHEC、CD34陽性かつCD32陽性) の他、微小血管内皮細胞 (microvessel endothelial cells: MVEC)、臍帯静脈内皮細胞 (umbilical-vein endothelial cells: UVEC) などが包含される。また、EPCから分化するECには、造血能を有する血管内皮細胞を指す、造血性血管内皮細胞 (hemogenic endothelial cell; HEC、CD34陽性かつCD73陰性) と、造血能を有さない血管内皮細胞を指す、非造血性血管内皮細胞 (non-hemogenic endothelial cell; non-HEC、CD31陽性、CD73陽性およびCD144陽性) の両方が包含される。

[0037] 本発明の細胞集団の製造方法における培地としては、前述した本発明の細胞クラスターの製造方法における多能性幹細胞用の培地、または多能性幹細胞等から分化する目的細胞用の培地、あるいはそれらの混合物を用いることができる。EPC用の基礎培地としては、例えば、DMEM/F-12 (Gibco)、Stempro-34 SFM (Gibco)、Essential 6培地 (Gibco)、Essential 8培地 (Gibco)、EGM (Lonza)、BulletKit (Lonza)、EGM-2 (Lonza)、BulletKit (Lonza)、EGM-2 MV (Lonza)、VascuLife EnGS Comp Kit (LCT)、Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium (Invitrogen)、ヒト微小血管内皮細胞増殖培地 (TOYOBO) などが挙げられる。EPC用の添加物としては、例えば、B27 Supplements (GIBCO)、BMP4 (骨形成因子4)、GSK β 阻害剤 (例、CHIR99021)、VEGF (血管内皮細胞成長因子)、FGF2 (Fibroblast Growth Factor (bFGF (basic fibroblast growth factor) ともいう))、Forskolin、SCF (Stem Cell Factor)、TGF β 受容体阻害剤 (例、SB431542)、Flt-3L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)、IL-3 (Interleukin 3)、IL-6 (Interleukin 6)、TPO (トロンボポイエチン)、hEGF (組換えヒト上皮細胞成長因子)、ヒドロコルチゾン、アスコルビン酸、IGF1、FBS (ウシ胎児血清)、抗生

物質（例えば、ゲンタマイシン、アンフォテリシンB）、ヘパリン、L-グルタミン、フェノールレッドおよびBBEからなる群より選ばれる1種以上が挙げられる。

[0038] EPC分化工程は、Wntシグナル活性化培養工程に続く所定の期間（例えば約2日間）、言い換えれば、前述した多能性幹細胞から所定のマイクロパターンを有する細胞クラスターへの分化誘導の開始から起算して2日目から4日目（Day 2～Day 4）に行うことが適切である。

[0039] YSMCからEPCに分化させるための培養方法、培地組成（基礎培地、分化誘導因子、その他の添加物などの、種類および使用量）、培養条件、その他の培養に関する事項としては、例えば、Ohta, R. et al, J. Vis. Exp. (148), e59823, doi:10.3791/59823 (2019)を参照することができる。例えば、EPC分化工程用の培地には、VEGF、FGF2（bFGF）、SCF、TGFβ阻害剤（例、SB431542）などの分化誘導因子を適量、添加することができる。

[0040] 本発明の細胞集団の製造方法は、必要に応じてその他の工程をさらに含むことができる。そのような任意工程としては、例えば、EPC分化工程により得られたEPCから他の細胞にさらに分化させる培養工程が挙げられる。

[0041] 本発明の一実施形態において、本発明の細胞集団の製造方法は、EPCから、CD34+CD32+卵黄静脈造血性内皮細胞（vitelline venous hemogenic endothelial cell: VVHEC）に分化させる培養工程（VVHEC分化工程）をさらに含むことができる。VVHECは、卵黄嚢中胚葉に由来するHECであり、胎児期初期における卵黄嚢内での造血を担う細胞として知られており、本発明ではYSMCからEPCを経て分化させることができる細胞である。VVHECの細胞マーカーとしては、CD34およびCD32以外に、FN1、ACTA2およびLYVE1、ならびに静脈マーカーであるNR2F2、APLN RおよびPROX1などが知られており、それらの1種または2種以上（好ましくは全て）が陽性であるかどうかにより特定することができる（陽性であればVVHEC、陰性であればVVHEC以外

)。

- [0042] V V H E C分化工程は、E P C培養工程に続く所定の期間（例えば約2日間）、言い換えれば、前述した多能性幹細胞から所定のマイクロパターンを有する細胞クラスターへの分化誘導の開始から起算して4日目から6日目（D a y 4～D a y 6）に行うことが適切である。
- [0043] E P CからV V H E Cに分化させるための培養方法、培地組成（基礎培地、分化誘導因子、その他の添加物などの、種類および使用量）、培養条件、その他の培養に関する事項としては、例えば、Matsybara et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 515(1), 2019を参照することができる。例えば、V V H E C分化工程用の培地には、V E G F、S C F、F i t - 3 L、I L - 3、I L - 6、T P Oなどの分化誘導因子を適量、添加することができる。
- [0044] 本発明の細胞集団の製造方法は、V V H E C分化工程により得られたV V H E Cから他の細胞、例えば単球／マクロファージ（C D 1 4陽性）、赤血球・骨髄球前駆細胞（C D 3 3陽性）などに分化させる培養工程をさらに含むこともできる。V V H E Cからそれらの細胞に分化させるための培養方法、培地組成（基礎培地、分化誘導因子、その他の添加物などの、種類および使用量）、培養条件、その他の培養に関する事項は公知の方法と同様とすることができる。V V H E Cから単球／マクロファージ（C D 1 4陽性）、赤血球・骨髄球前駆細胞（C D 3 3陽性）などに分化させる場合は、例えば、Gene I. Uenishi et al, Nature Communications (2018)9:1828を参照することができる。
- [0045] ーオルガノイドまたは立体臓器の製造方法ー
- 本発明のオルガノイドまたは立体臓器の製造方法は、本発明の細胞クラスターの製造方法により得られた細胞クラスター、または本発明の細胞集団の製造方法により得られた細胞集団の少なくとも一部を三次元培養する工程を含む。
- [0046] 本明細書において「三次元培養」するとは、細胞外マトリックス等の足場

となる成分を含む培地中に包埋した状態で細胞を培養することを指す。三次元培養によるオルガノイドまたは立体臓器の製造方法としては、様々な方法および実施形態が一般的または公知になっている（例えば、前掲特許文献1参照）。本発明では、オルガノイドまたは立体臓器を製造するための原料となる細胞として、本発明による細胞クラスターまたは細胞集団を用いること以外は、従来の一般的または公知の製造方法と同様の方法および実施形態により、オルガノイドまたは立体臓器を製造することができる。

[0047] また、近年では、オルガノイドの一種といえる、初期胚の構造を三次元的に構築したembryoidおよびgastruloidの製造方法も公知である。Y SMCやA E Cのように胚と外胚葉の境界領域に位置する細胞を含む、本発明による細胞クラスターまたは細胞集団を用いることにより、構造をより精緻に再現できるembryoidまたはgastruloidを製造できる可能性がある。

[0048] ーキットー

本発明の別の側面により、W n tシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養することにより、多能性幹細胞から所望の細胞が富化された細胞クラスターを製造するためのキットも提供される。本発明によるキットは、例えば、1以上のW n tシグナル活性化剤を含む、卵黄囊中胚葉細胞（Y SMC）が富化された細胞クラスターの製造用キット、または1以上のW n tシグナル抑制剤を含む、羊膜外胚葉細胞（A E C）が富化された細胞クラスターの製造用キットである。このようなキットに関する事項、例えばW n tシグナル活性化剤、W n tシグナル抑制剤、上記それぞれのキットを用いる培養方法、キットに含めることができるその他の構成部材等については、本明細書において、細胞クラスターの製造方法、細胞集団の製造方法などとの関係において記載した事項と同様であり、それらの記載事項を参照することができる。

[0049] ー定義ー

・多能性幹細胞

本明細書において「多能性幹細胞（pluripotent stem cell）」とは、生体

の種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力を有する幹細胞を指す。本発明において使用可能な多能性幹細胞は、特に限定されないが、例えば、人工多能性幹細胞（iPS細胞と称することもある）、胚性幹細胞（ES細胞と称することもある）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞、精子幹細胞、胚性生殖細胞などが挙げられる。

[0050] 「人工多能性幹細胞」（iPS細胞）とは、哺乳動物体細胞または未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPSC (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676) のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPSC (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.)、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPS細胞 (Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞 (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101 - 106)、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPS細胞 (Okita K et al. Nat. Methods 2011 May;8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.) も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28の4因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞 (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.)、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞 (Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146)、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞 (特開2008-307007号) 等も用いることができる。このほか、公開されている全ての非特許文献 (例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Bio

technology, (2008) 26, No 7, 795-797) または特許文献 (例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008/2336610、US2009/047263、W02007/069666、W02008/118220、W02008/124133、W02008/151058、W02009/006930、W02009/006997、W02009/007852) に記載されている、当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

[0051] 人工多能性幹細胞 (iPS細胞) としては、NIH、理研 (理化学研究所)、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学の201B7株、253G1株、253G4株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、625A4株、648A1株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1231A3株、1383D2株、1383D6株等が挙げられる。あるいは、京都大学やCellular Dynamics International等から提供される臨床グレードの細胞株並びにそれらの細胞株を用いて作製された研究用および臨床用の細胞株等を用いてもよい。

[0052] 「胚性幹細胞」 (ES細胞) としては、マウスESCであれば、inGenious targeting laboratory社、理研 (理化学研究所) 等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞であれば、NIH、理研、京都大学、Cellartis社が樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。たとえば、ヒトES細胞株としては、NIHのCHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1~HUES28株等、WisCell ResearchのH1株、H9株、理研のKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。あるいは、臨床グレードの細胞株並びにそれらの細胞株を用いて作製された研究用および臨床用の細胞株等を用いてもよい。

[0053] ・細胞マーカー

本明細書において「細胞マーカー」は、所定の細胞型において特異的に発現する (陽性マーカー) または発現しない (陰性マーカー) 遺伝子、具体的にはゲノム中の当該遺伝子の転写によるmRNAとして、またはそのmRNAの翻訳によるタンパク質として、生成する (陽性マーカー) または生成し

ない（陰性マーカー）物質を指す。細胞マーカーは、好ましくは蛍光物質により標識（染色）可能であり、当該細胞マーカーを発現している細胞の検出、濃縮、単離等を容易に行える、細胞表面に発現するタンパク質（細胞表面マーカー）である。

[0054] マーカー遺伝子が「陽性」であるとは、その遺伝子のmRNAまたはタンパク質の発現量が、当業者にとって一般的または公知の手法により、検出可能である、または所定の閾値（バックグラウンドレベル等）よりも高いことを意味する。マーカー遺伝子が「陰性」とは、その遺伝子のmRNAまたはタンパク質の発現量が、当業者にとって一般的または公知の手法により、検出不可能である、または所定の閾値（バックグラウンドレベル等）よりも低いことを意味する。

[0055] 細胞マーカーが陽性であるか陰性であるかは、当業者にとって一般的または公知の手法により、定性的または定量的な結果をもって判定することができる。タンパク質としての細胞マーカーは、当該タンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーなどを利用して、検出するまたは発現量を測定することができる。mRNAとしての細胞マーカーは、当該mRNAに特異的な核酸を用いたアッセイ、例えば、RT-PCR（定量的PCRを含む）、マイクロアレイ、バイオチップなどを利用して、検出するまたは発現量を測定することができる。

[0056] ・オルガノイド

本明細書において「オルガノイド」は、複数種の細胞を組み合わせて人為的に創出される、各種の臓器や組織などに類似する三次元構造体を指す。オルガノイドには、臓器オルガノイド、癌オルガノイドなども包含され、広義には、初期胚の構造を三次元的に構築したembryoid（例、Science 07 Jun 2019:Vol. 364, Issue 6444, pp. 948-951; DOI: 10.1126/science.aax0164）やgastruloid（例、Nature volume 582, pages410-415(2020)）も包含される。「臓器オルガノイド」には、各種の臓器または組織に類似した機能や構造

を有する、オルガノイドとして比較的成熟した段階にあるもののみならず、そのような複雑化の初期段階にある「器官芽」、「原基」などと呼ばれている構造体も包含される。臓器オルガノイドには、例えば肝臓、膵臓、腎臓、心臓、肺臓、脾臓、食道、胃、甲状腺、副甲状腺、胸腺、生殖腺、脳、脊髄など、様々な種類の臓器オルガノイドが公知になっている（例、<https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMra1806175>、<https://www.nature.com/articles/s41568-018-0007-6>、<http://www.amsbio.com/brochures/organoid-culture-handbook.pdf>参照）。

[0057] オルガノイドの立体構造は、肉眼または顕微鏡観察により確認することができる。そのような立体構造の確認に加えて、臓器含まれる細胞に応じたマーカー、特に臓器の実質細胞のマーカーが陽性であるかによって、さらに好ましくは培養上清中にそれらのマーカーのタンパク質が分泌されているかによって、判別することができる。

[0058] ・立体臓器

本明細書において「立体臓器」は、成熟臓器オルガノイドともいえる、臓器オルガノイドよりも一層成熟した細胞集団または構造を含む構造体を指す。

[0059] 臓器オルガノイドから立体臓器が得られたかどうかは、例えば、構造体中の細胞の密度（所定の基準を超えるか等）、構造体の立体的な形状（一定水準より立体的であるか等）、機能や形質（代謝機能等の所定の機能または形質を獲得しているか等）、細胞マーカー（細胞マーカーの遺伝子またはタンパク質の発現が陽性であるか、陽性細胞の密度が所定の基準を超えるか、培養上清中のマーカータンパク質分泌量が所定の基準を超えるか等）などの一つまたは複数の観点から判定することができる。上記の細胞の密度、立体的な形状、機能や形質、細胞マーカーなどは、臓器オルガノイドおよび立体臓器に応じて、適宜設定することができるが、例えば、生体内の臓器と同程度の、またはそれに近似した水準を達成しているかどうかを、上記のような判定の基達とすることができる。

[0060] 本発明における多能性幹細胞のコロニー、細胞クラスター、細胞集団、オルガノイド、立体臓器等に含まれる細胞は、ヒトに由来するものであってもよいし、ヒト以外の動物、例えばマウス、ラット、イヌ、ブタ、サルなどの哺乳動物に由来するものであってもよい。例えば、臓器オルガノイドまたは立体臓器の用途が、ヒトへの移植や、ヒトの医薬の開発（従来の動物実験やヒト細胞試験等では発見されにくい薬物中毒を引き起こす薬物の検出等）などである場合は、細胞はヒトに由来するものが好ましい。

[0061] 本明細書において、細胞、化合物、その他の物質について、それらが単数形で記載されている事項と複数形で記載されている事項は、別途明記されていない限り、相互に変換して解釈可能であるものとする。

[0062] 「～を含む (comprise、include、contain等)」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。一方、「～からなる (consisting of等)」とは、その語句に続くあらゆる要素を包含し、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であり、他の要素は実質的に存在しないことを示す。「～から本質的になる (consisting essentially of等)」とは、その語句に続く任意の要素を包含し、かつ、その要素について本開示で特定された活性又は作用に影響しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「～から本質的になる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であるが、他の要素は任意選択であり、それらが列挙された要素の活性又は作用に影響を及ぼすかどうかに応じて、存在させる場合もあり、存在させない場合もあることを示す。

実施例

[0063] 以下の実施例において、「Day」は、ヒトiPS細胞コロニーの分化誘導開始からの日数を表す。「Day 0」が、Wntシグナル調節下での培養開始時である。

[0064] [実施例1] Wntシグナル調節下における卵黄嚢中胚葉細胞および羊膜外胚葉

細胞の作製

[1] Wntシグナル活性化培養工程によるヒト卵黄嚢中胚葉細胞の作製（本発明の第1実施形態）

ヒトiPS細胞（625A4；京都大学iPS研究所）を、AK02N（味の素）（10cm dish; 8ml、24-well plate; 0.5ml）中、5%CO₂、37℃で6~7日間培養することで、直径500-700μmのiPS細胞コロニーを形成させた。得られたコロニーを、Essential 8培地（Gibco）（10cm dish; 8ml、24-well plate; 0.5ml）にBMP4（80 ng/ml）、VEGF（80 ng/ml）およびCHIR99021（2μM）を添加した培地中、5%CO₂、37℃で2日間培養した（Day 0-2）。

[0065] [2] Wntシグナル阻害培養工程によるヒト羊膜外胚葉細胞の作製（本発明の第2実施形態）

ヒトiPS細胞（625A4；京都大学iPS研究所）を、AK02N（味の素）（10cm dish; 8ml、24-well plate; 0.5ml）中、5%CO₂、37℃で6~7日間培養することで、直径500-700μmのiPS細胞コロニーを形成させた。得られたコロニーを、Essential 8培地（Gibco）（10cm dish; 8ml、24-well plate; 0.5ml）にBMP4（80 ng/ml）、VEGF（80 ng/ml）およびIWP-2（2μM）を添加した培地中、5%CO₂、37℃で2日間培養した（Day 0-2）。

[0066] 対照として、[1] および [2] と同様にしてiPS細胞コロニーを形成させた後、得られたコロニーを、Essential 8培地（Gibco）（10cm dish; 8ml、24-well plate; 0.5ml）にBMP4（80 ng/ml）およびVEGF（80 ng/ml）を添加した培地中、5%CO₂、37℃で2日間培養した（Day 0-2）。

[0067] [3] 免疫細胞染色による細胞クラスターの分化マーカー解析

[1] もしくは [2] のDay 0-2の工程で分化誘導を実施後、培地を除去してPBS(-)（GIBCO）で1回洗浄後、細胞に4%パラホルムアルデヒドを500μl/24 wellの容量で添加して15分間室温で放置した。その後PBS(-)で3回洗浄し、4℃で一晩保存した。その後細胞にPROTEIN BLOCK SERUM-FREE blocking溶液 [DAKO, X909] を500μl/24wellの容量で添加して60分間室温で放置してブロッキングをおこなった。その後1% blocking溶液 in PBS(-)にターゲット

ットとなる抗原に対する1次抗体 (1/100 Anti-GATA6 (Abcam, ab22600), 1/50 Anti-Brachyury T (R&D, AF2085), 1/400 Anti-Sox2 (CST, 3579P2), 1/100 Anti-CDX2 (R&D, MAB3665), 1/50 Anti-AP-2a (Santa Cruz, sc-12726)) をいずれか加えた、1次抗体溶液を500 μ l/24wellの容量で添加し、室温60分または4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。次いでPBS(-)で3回洗浄後、1% blocking溶液 in PBS(-)に1次抗体に対応する2次抗体 (1/1000 Alexa Flour 555, 1/1000 Alexa Flour 647および 1/1000 DAPI-HCB Hycult Biotech, HM2167) を加えた、2次抗体溶液を500 μ l/24wellの容量で添加し、室温で60分インキュベートした。その後PBS(-)で3回洗浄後、PBS(-)500 μ l/24wellの容量で添加、保持し、LSM880共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) を用いて蛍光画像の取得を実施した。取得した画像の処理および定量解析は画像解析ソフト「Fiji」を用いて実施した。

[0068] [1] のDay 2の細胞クラスターについて、細胞マーカーBrachyury、GATA6 およびFOXF1に関する解析結果を図1に示す。本発明の第1実施形態に従い、培地にWntシグナル活性化剤であるCHIR99021を添加した場合 (+CHIR) は、添加しなかった場合 (-) に比べて、Brachyury陰性、GATA6陽性かつFOXF1陽性のYSMCが富化された、言い換えれば外縁部のYSMC領域が増加した、細胞クラスターが形成されることが確認された (図1 B、C)。なお、光学顕微鏡による観察像により、本発明の第1実施形態により得られる細胞クラスターは、従来の方法により得られる細胞クラスターと形態学的にも相違することが確認された (図1 A)。また、これらの図に示されているように、本発明の方法により得られた細胞クラスターは、所定の細胞が二次元的に明確な層状構造を形成していることが分かる。

[0069] [1] および [2] それぞれのDay 2の細胞クラスターについて、細胞マーカーGATA6、SOX2、CDX2およびTFAP2Aに関する解析結果を図2に示す。本発明の第2実施形態に従い、培地にWntシグナル抑制剤であるIWP-2を添加した場合 (+IWP-2) は、添加しなかった場合 (-) に比べて、CDX2陽性 (中段) かつTFAP2A陽性 (下段) のAECが富化された、言い換えれば外縁部にAEC領域を備

えた、細胞クラスターが形成されることが確認された。培地にCHIR99021を添加した場合 (+CHIR) と異なり、IWP-2を添加した場合 (+IWP-2) は、外縁部におけるGATA6陽性細胞は少数であった (上段)。+CHIRの条件下では、CDX2陰性の領域 (中段) はGATA6陽性 (上段) であること、+IWP-2の条件下では、CDX2陽性 (中段) の領域でGATA6陰性 (上段) であることも確認された。

[0070] [4] ヒト卵黄静脈造血性内皮細胞の作製

[1] によるヒト卵黄囊中胚葉細胞の作製に引き続き、Essential 6培地 (Gibco) (10cm dish; 8ml) にVEGF (80ng/ml)、FGF2 (25ng/ml)、SCF (50ng/ml) およびSB431542 (2 μ M) を添加した培地に交換し、5%CO₂、37°Cでさらに2日間培養することで血球-血管内皮共通前駆細胞を誘導した。その後、Stempro-34 SFM (Gibco) (10cm dish; 8ml) にVEGF (80ng/ml)、SCF (50ng/ml)、Flt-3L (50ng/ml)、IL-3 (50ng/ml)、IL-6 (50ng/ml) およびTP0 (5ng/ml) を添加した培地に交換し、5%CO₂、37°Cで2日間培養した後、上記組成の培地からVEGFを除いた培地に交換して、5%CO₂、37°Cで2日間培養することで、CD34陽性かつCD32陽性の卵黄静脈造血性内皮細胞を誘導した。

[0071] [5] 免疫細胞染色による細胞集団の分化マーカー解析

[4] のDay 4-6の工程で分化誘導を実施後、1次抗体として1/50 Anti-CD34 (Abcam, ab81289) を用いるよう変更したこと以外は [3] と同様の手順により、免疫細胞染色を行った。[4] のDay 6の細胞集団についての、細胞マーカーBrachyuryおよびCD34に関する解析結果を図3 (A) に示す。本発明の第1実施形態に従って得られた細胞クラスター (+CHIR) の外縁部のYSM領域からは、豊富なCD34陽性の血管内皮前駆細胞が出現することが確認された。

[0072] [6] フローサイトメトリーを用いた分化マーカー解析

[4] のDay 6-8の工程で卵黄静脈造血性内皮細胞を分化誘導後、培地を除去してPBS(-) (GIBCO) で2回洗浄後、TrypLE Express (Gibco) を3mL/dishの容量で添加して15分間37°Cで放置した。その後P1000 マイクロピペッ

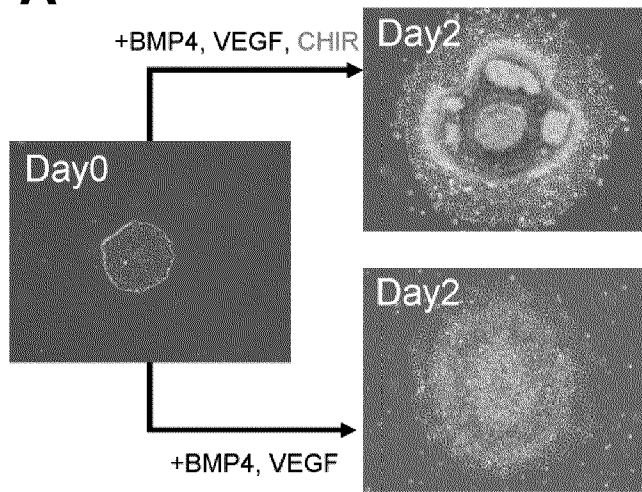
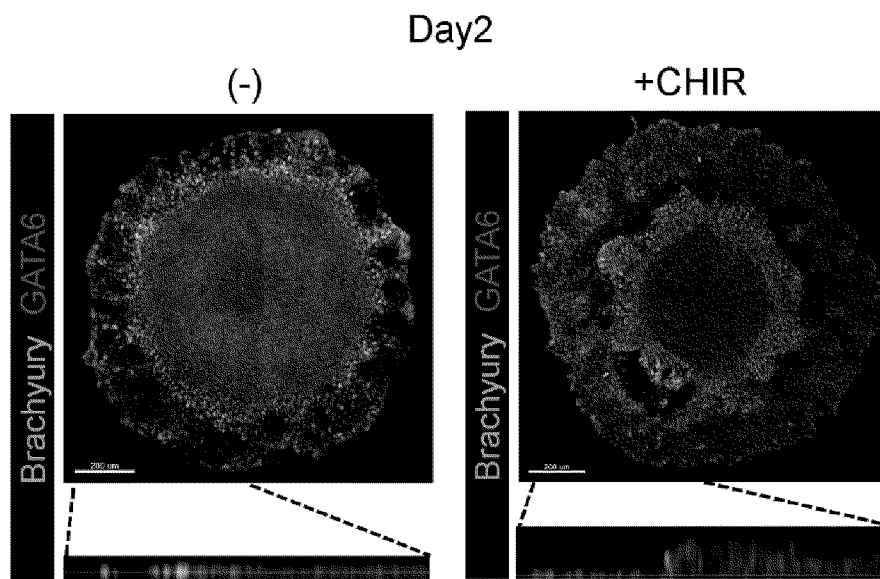
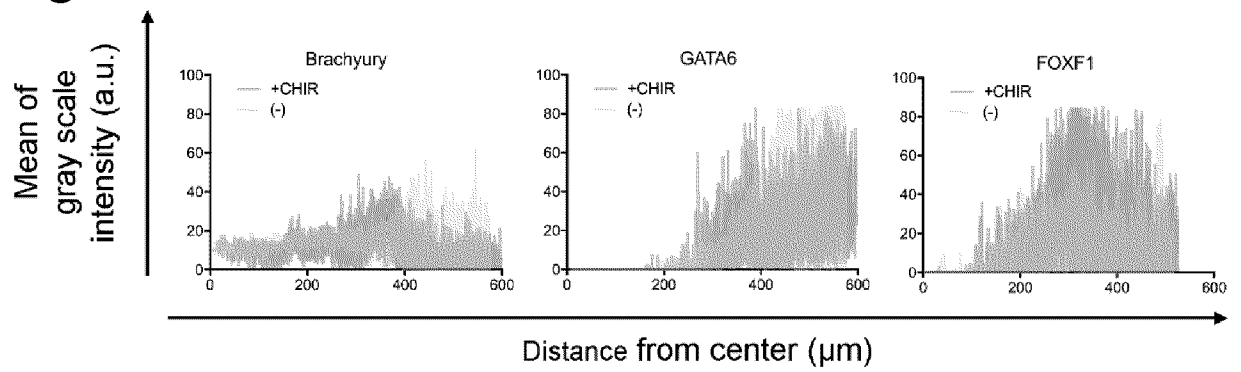
トによるピペッティングにより、細胞を乖離しながら15mLチューブへ回収し、Stempro-34 SFM (Gibco) 培地を7mL添加した後、1000 rpm、室温、5分間遠心分離した。上清を除去後、1mM EDTA、4% FBS を含むPBS(-)バッファを用いて1度洗浄後、1次抗体溶液 (1/50 PE-CD32 (BioLegend, Cat: 303205), BV4 21-CD34 (BD Biosciences, Cat: 562577) in BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer) 50 μ lにて細胞を懸濁し、氷上で30分間静置した。次いで1mM EDTA、4% FBS を含むPBS(-)バッファで2回洗浄後、1/1000 DAPI、1mM EDTA、4% FBS を含むPBS(-)バッファにて細胞を懸濁し、40 μ mセルストレーナーキャップ付きチューブに移した。得られた抗体染色細胞懸濁液を用いて、BD LSRFortessa フローサイトメトリーによって分化マーカーの解析を実施した。フローサイトメトリーから得られたデータの解析は、FlowJoを用いて実施した。

[0073] [4] のDay 8の細胞集団についての、フローサイトメトリーの結果を図3 (B) に示す。本発明の第1実施形態に従って得られた細胞クラスター (+CH IR) の外縁部のYSM領域からは、対照 (-) と比較して、より多くのCD34陽性かつCD32陽性の卵黄静脈造血性内皮細胞が産生されること、言い換えればYSM領域中のCD34陽性の血管内皮前駆細胞は、さらにCD32陽性である卵黄静脈造血性内皮細胞への分化能を有することが確認された。

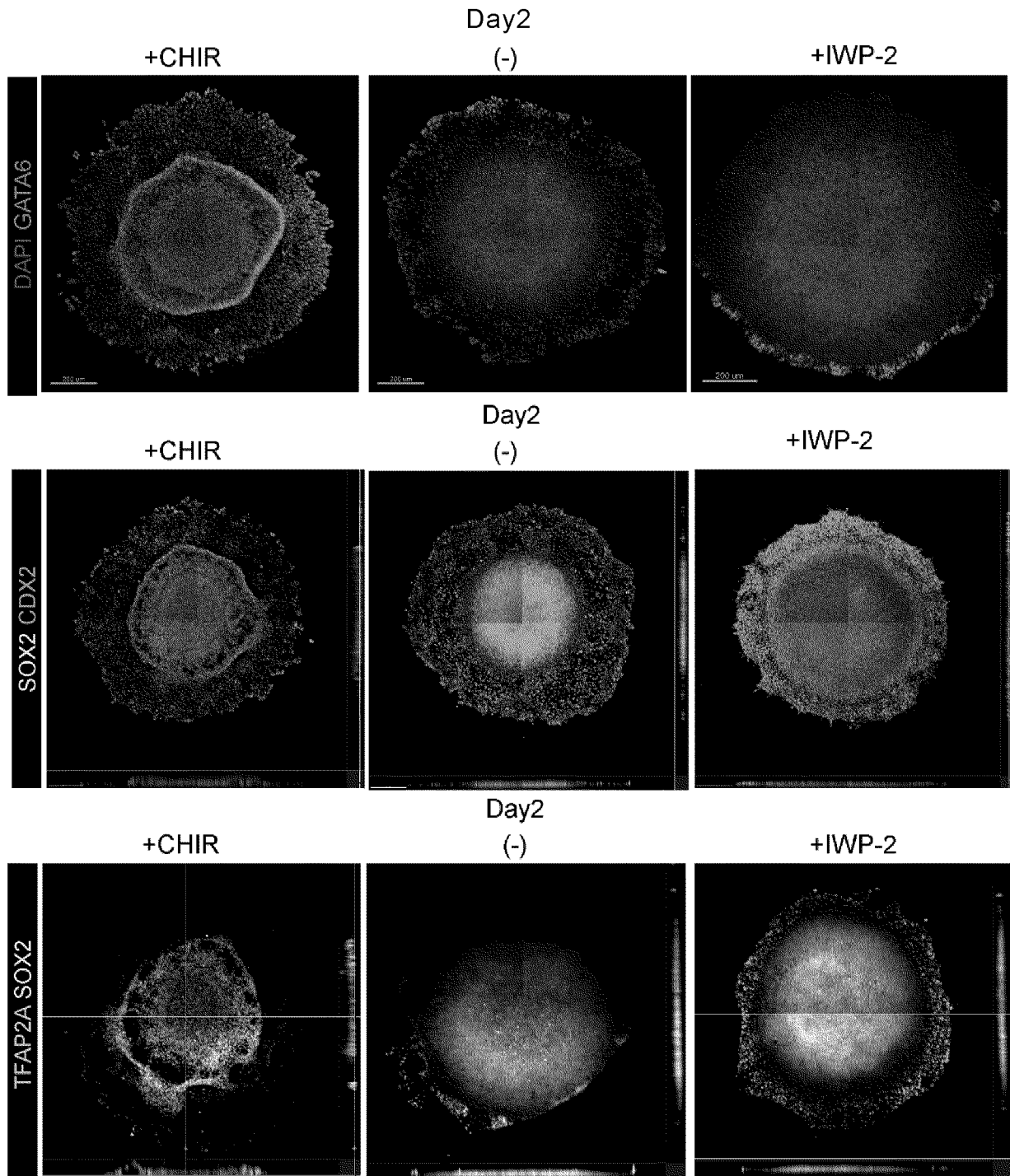
請求の範囲

- [請求項1] 多能性幹細胞から所望の細胞が富化された細胞クラスターを製造する方法であり、W n t シグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程を含む、方法。
- [請求項2] 前記所望の細胞が、卵黄囊中胚葉細胞であり、前記W n t シグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程が、W n t シグナルを活性化する条件下で多能性幹細胞を二次元培養する、W n t シグナル活性化培養工程である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記W n t シグナル活性化培養工程が、W n t シグナル活性化剤を添加した培地を用いて多能性幹細胞を二次元培養する工程である、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項4] 前記W n t シグナル活性化剤がG S K 3 阻害剤である、請求項 3 に記載の方法。
- [請求項5] 前記W n t シグナル活性化培養工程が、前記多能性幹細胞の培養開始時に行われる、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項6] 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項7] 請求項 2 に記載のW n t シグナル活性化培養工程の後、得られた前記卵黄囊中胚葉細胞からC D 3 4 + 血管内皮前駆細胞に分化させる培養工程をさらに含む、細胞集団の製造方法。
- [請求項8] 前記C D 3 4 + 血管内皮前駆細胞から、C D 3 4 + C D 3 2 + 卵黄静脈造血性内皮細胞に分化させる培養工程をさらに含む、請求項 7 に記載の方法。
- [請求項9] 請求項 1 に記載の方法により得られた細胞クラスター。
- [請求項10] 請求項 7 に記載の方法により得られた細胞集団。
- [請求項11] 請求項 9 に記載の細胞クラスターまたは請求項 1 0 に記載の細胞集団の少なくとも一部を三次元培養する工程を含む、オルガノイドまたは立体臓器の製造方法。

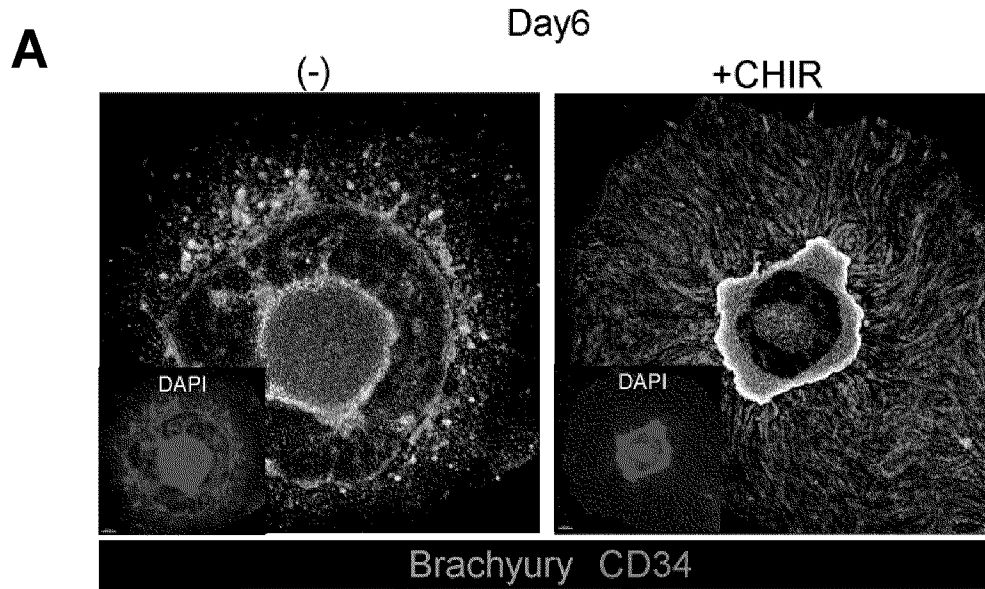
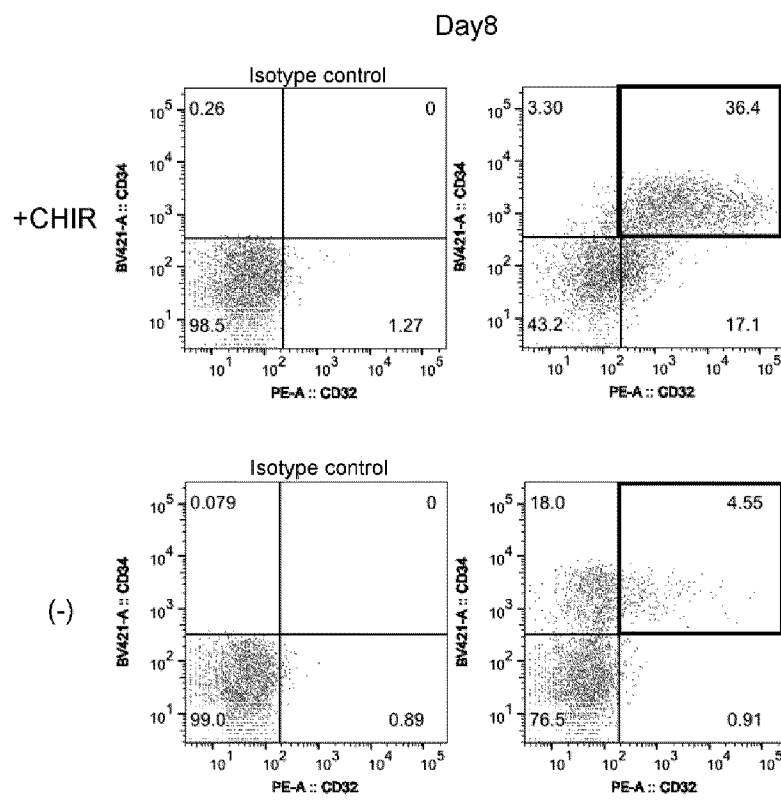
- [請求項12] 請求項11に記載の製造方法により得られた、オルガノイドまたは立体臓器。
- [請求項13] 前記所望の細胞が、羊膜外胚葉細胞であり、前記Wntシグナル調節下で多能性幹細胞を二次元培養する工程が、Wntシグナルが抑制された条件下で多能性幹細胞を二次元培養する、Wntシグナル抑制培養工程である、請求項1に記載の方法。
- [請求項14] 前記Wntシグナル抑制培養工程が、Wntシグナル阻害剤を添加した培地を用いて行われる、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 前記Wntシグナル阻害剤がIWP-2である、請求項14に記載の方法。

[]1**A****B****C**

[2]



[図3]

**B**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/009925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 5/073</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i FI: C12N5/073; C12N5/071 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) C12N5/073; C12N5/071		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 2020/175594 A1 (PUBLIC UNIV CORP YOKOHAMA CITY UNIV et al.) 03 September 2020 (2020-09-03) example 2	1-12
Y	example 2	2-5, 7, 8, 10-12
X	WO 2020/203713 A1 (PUBLIC UNIV CORP YOKOHAMA CITY UNIV et al.) 08 October 2020 (2020-10-08) example 1	1-12
Y	example 1	2-5, 7, 8, 10-12
X	WANG, K. et al. Robust differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial cells via temporal modulation of ETV2 with modified mRNA. Sci. Adv. 24 July 2020, vol. 6, no. 30, eaba7606, pp. 1-15 p. 1, right column, paragraph [0003], p. 2, left column, paragraph [0001], fig. 1A, 5	1, 6, 9, 11, 12
X	ZHENG, Y. et al. Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells. Nature. September 2019, vol. 573, no. 7774, pp. 421-425, 1-23 fig. 3b, extended data fig. 10	1, 6, 9, 13-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "T" 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 17 May 2022		Date of mailing of the international search report 24 May 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/009925

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/130474 A2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 15 November 2007 (2007-11-15) claims	2-5, 7, 8, 10-12
.....		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/009925

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/175594 A1	03 September 2020	(Family: none)	
WO 2020/203713 A1	08 October 2020	(Family: none)	
WO 2007/130474 A2	15 November 2007	JP 2009-535058 A claims	
		US 2007/0259423 A1	
		EP 2027258 A1	
		CA 2650561 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/073(2010.01)i; C12N 5/071(2010.01)i FI: C12N5/073; C12N5/071		
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）） C12N5/073; C12N5/071		
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		
日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2022年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2022年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2022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 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 2020/175594 A1 (公立大学法人横浜市立大学、外1名) 03.09.2020 (2020 - 09 - 03)	1-12
Y	実施例2 実施例2	2-5, 7, 8, 10-12
X	WO 2020/203713 A1 (公立大学法人横浜市立大学、外1名) 08.10.2020 (2020 - 10 - 08)	1-12
Y	実施例1 実施例1	2-5, 7, 8, 10-12
X	WANG K. et al., Robust differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial cells via temporal modulation of ETV2 with modified mRNA, Sci. Adv., 2020.07.24, Vol.6, No.30, eaba7606, pp.1-15 1頁右欄3段落, 2頁左欄1段落, Fig.1A, Fig.5	1, 6, 9, 11, 12
X	ZHENG Y. et al., Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells, Nature, 2019.09, Vol.573, No.7774, pp.421-425, 1-23 Fig.3b, Extended Data Fig.10	1, 6, 9, 13-15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	“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	
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的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		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
17.05.2022	24.05.2022	
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）	
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	小金井 悟 4N 3961 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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	WO 2007/130474 A2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 15.11.2007 (2007 - 11 - 15) Claims	2-5, 7, 8, 10-12
<hr/>		

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/JP2022/009925

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2020/175594	A1	03.09.2020	(ファミリーなし)	
WO	2020/203713	A1	08.10.2020	(ファミリーなし)	
WO	2007/130474	A2	15.11.2007	JP 2009-535058	A
				特許請求の範囲	
				US 2007/0259423	A1
				EP 2027258	A1
				CA 2650561	A