明　細　書

発明の名称 ： 多能性幹細胞の分化制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞の分化制御方法に関する。より詳しくは、多能性幹細胞の分化を制御することで、所望の多能性幹細胞由来眼細胞原基を選択的に誘導する方法及びその利用に関するものである。

背景技術

[0002] ヒトES細胞やヒトiPS細胞などのヒト多能性幹細胞は、その再生医療への応用が世界的に注目されている。ヒト多能性幹細胞を再生医療に応用するためには、これら幹細胞を高効率で安定的に体細胞に分化誘導する技術の開発が必要であり、ヒト多能性幹細胞から任意の体細胞への選択的分化誘導方法について各種検討が行われている。

[0003] 例えば、角膜上皮幹細胞疲弊症などの重篤な角膜疾患に対する新規治療法として、本願の発明者らはiPS細胞から角膜上皮細胞シートを作製する技術を開発し、動物モデルを用いてその有効性を確認した（非特許文献１）。非特許文献１に記載の分化誘導法によりiPS細胞から生成される細胞は、眼周囲の様々な細胞を含む細胞集団であるため、角膜上皮細胞シートの作製に用いるためには、使用する細胞を角膜上皮細胞に純化する必要がある。そのため、非特許文献１では、角膜上皮細胞特異的な細胞表面マーカーに対する抗体を用い、FACSソーティングにて純化を行っている。

[0004] FACSソーティングは、抗体染色した細胞を液流で流し、レーザーの照射により細胞表面抗原の発現を確認し、特定の細胞を分取する技術であるが、細胞が通過する全流路の無菌性を担保することが難しく、細胞の汚染が懸念されるという問題がある。また、FACSソーティングは、回収した細胞のダメージが大きいという問題がある。さらに、FACSソーティングは、用いる機器のメンテナンスに専門的な知識や技術を要する。それゆえ、FACSソーティングは、移植用角膜上皮細胞シートの作製に用いるための細胞を大量に調製する

場面では、必ずしも理想的な方法ではなく、非特許文献１の技術を実用化及び産業化するうえで課題が残っている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Hayashi et al., Nature. 2016 Mar 17;531(7594):376-80. doi: 10.1038/nature17000. Epub 2016 Mar 9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、多能性幹細胞を分化誘導して得られた細胞集団から特定の細胞を分取するのではなく、多能性幹細胞を眼細胞原基に分化誘導する際に予め分化の方向性を制御することで、得られる細胞集団における細胞比率を制御できる、多能性幹細胞の分化制御方法に関する。

[0007] また、本発明は、細胞比率を制御することで、例えば、移植用角膜上皮細胞シートの作製に使用可能な角膜上皮細胞集団や該角膜上皮細胞以外の眼周囲の細胞に特化した細胞集団を簡便に製造する方法及び前記方法により得られる細胞集団の利用に関する。

[0008] またさらに、本発明は、多能性幹細胞の眼細胞原基への分化誘導時に分化の方向性を制御できる、前記した細胞の分化制御剤に関する。

課題を解決するための手段

[0009] 上記課題を解決するため、本発明者らはiPS細胞の分化誘導条件について鋭意検討した結果、分化誘導時に存在させるラミニンの種類を変更することで、得られる細胞集団における分化細胞の比率を制御できることを見出した。選択的分化誘導においては、培地に添加する増殖因子と細胞外マトリックスの選択がそれぞれ重要であるが、ラミニンの複数のアイソフォームが同じ分化誘導方法において分化誘導される細胞の方向性を各方向に制御できることは本発明者らが初めて見出したことである。

[0010] すなわち、本発明は、以下の〔１〕～〔１０〕に関する。

〔１〕　多能性幹細胞との結合親和性を指標としてラミニン又はそのフラグメントを選択し、該ラミニン又はそのフラグメントの存在下に多能性幹細胞を分化誘導することを特徴とする、多能性幹細胞の分化制御方法。

〔２〕　ラミニン332又はラミニン332E8フラグメントの存在下に角膜上皮細胞への分化を制御する、前記〔１〕記載の分化制御方法。

〔３〕　ラミニン111又はラミニン111E8フラグメントの存在下に神経細胞への分化を制御する、前記〔１〕記載の分化制御方法。

〔４〕　ラミニン211又はラミニン211E8フラグメントの存在下に神経堤細胞への分化を制御する、前記〔１〕記載の分化制御方法。

〔５〕　ラミニン411又はラミニン411E8フラグメントの存在下に網膜細胞への分化を制御する、前記〔１〕記載の分化制御方法。

〔６〕　ラミニン411又はラミニン411E8フラグメントの存在下に神経堤細胞への分化を制御する、前記〔１〕記載の分化制御方法。

〔７〕　前記〔１〕～〔６〕いずれかに記載の分化制御方法により誘導された多能性幹細胞の分化細胞を培養する、眼周囲細胞集団の製造方法。

〔８〕　得られる細胞集団が角膜上皮細胞集団である、前記〔７〕記載の製造方法。

〔９〕　前記〔８〕記載の製造方法により得られた角膜上皮細胞集団を使用することを特徴とする、移植用角膜上皮細胞シートの製造方法。

〔１０〕　ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメントを含有してなる、多能性幹細胞の分化制御剤。

[0011]　また、本発明の一態様として、以下の〔１１〕～〔１２〕も含む。

〔１１〕　多能性幹細胞の分化を制御するための、ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメントの使用。

〔１２〕　多能性幹細胞の分化制御において使用するための、ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選

ばれるラミニン又はそのE8フラグメント。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、多能性幹細胞を分化誘導して得られた細胞集団から別途所望の細胞を分取するのではなく、簡便な操作で、例えば、眼周囲の細胞集団の中から、移植用角膜上皮細胞シートの作製に使用可能な角膜上皮細胞集団を選択的に大量に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、iPS細胞から眼周囲細胞へ分化誘導する方法の概略図を示す図である。

[図2]図２は、iPS細胞由来分化細胞の経時的な形態変化の一例を示す図である。

[図3]図３は、iPS細胞由来分化細胞に発現するマーカータンパク質の一例を示す図である。

[図4]図４は、iPS細胞由来分化細胞の経時的な遺伝子発現解析の結果を示す図である。

[図5]図５は、iPS細胞のコロニー形成過程のタイムラプス解析の結果を示す図である。

[図6]図６は、iPS細胞のコロニーにおけるHippo経路に関与する転写共役因子YAPの局在と神経外胚葉分化との関係を示す図である。

[図7]図７は、iPS細胞から分化誘導した細胞の角膜上皮マーカー陽性率を解析した結果を示す図である。

[図8]図８は、分化誘導過程における未分化マーカーの遺伝子発現解析と分化誘導６週におけるiPS細胞由来角膜上皮細胞シートの断面を示す図である。

[図9]図９は、分化誘導で形成されたSEAM構造中の眼周囲細胞の各ラミニンアイソフォーム上での相対細胞生存率を示す図である。

[図10]図１０は、分化誘導された細胞集団における分化細胞の存在比率を示す図である。

[図11]図１１は、分化細胞のWntシグナルターゲット遺伝子の発現解析の結果

を示す図である。

[図12]図１２は、ラミニンのコーティング濃度による分化制御を示す図である。

[図13]図１３は、ラミニンの種類及びコーティング濃度によるiPS細胞由来角膜上皮細胞の分化効率への影響を示す図である。

[図14]図１４は、各ラミニン上の分化細胞における神経堤細胞マーカー遺伝子発現量を示す図である。

[図15]図１５は、２１１上で分化した細胞における眼周囲神経堤細胞マーカーの発現を示す図である。

[図16]図１６は、各ラミニン上で分化した細胞におけるWntシグナル経路関連遺伝子発現量を示す図である。

[図17]図１７は、ラミニン２１１または５１１上で、分化開始から３日間、Wntシグナルの促進剤または活性化剤で処理後、２週間分化させた細胞における神経堤マーカーのFACS解析の結果を示す図である。

[図18]図１８は、ラミニン２１１またはラミニン５１１上での神経堤細胞への分化におけるWntシグナル経路の影響を検討した免疫染色の結果を示す図である。

[図19]図１９は、ラミニンによるiPS細胞コロニーのリン酸化MLCの局在への影響を検討した結果を示す図である。

[図20]図２０は、ラミニンによるiPS細胞コロニーのリン酸化MLCの発現量と細胞間相互作用への影響を検討した結果を示す図である。

[図21]図２１は、ラミニンによるiPS細胞コロニー内部・外縁部の細胞密度への影響を検討した結果を示す図である。

[図22]図２２は、ラミニンによるiPS細胞のYAP活性への影響を検討した結果を示す図である。

[図23]図２３は、ラミニン濃度によるiPS細胞コロニーの凝縮と神経外胚葉分化との関係を検討した結果を示す図である。

[図24]図２４は、iPS細胞コロニーにおけるYAP転写活性と神経外胚葉分化と

の関連を検討した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 非特許文献１において、発明者らは、iPS細胞からラミニン511E8フラグメントを用いて眼全体の発生を再現させた細胞集団を取得し、得られた細胞集団から角膜上皮（前駆）細胞のみをFACSで回収して純化することにより高純度な細胞集団を調製していた。ここで、眼全体の発生を再現させた細胞集団とは、発生期の眼を構成する様々な細胞群、例えば、角膜上皮細胞、網膜細胞、水晶体上皮細胞、神経堤細胞などを包含するものであり、細胞ごとに対応する眼の部位における再生医療の開発に寄与する可能性が秘められている。しかしながら、前記方法に従って眼全体の細胞を含む細胞集団から目的の細胞を高純度に含む細胞集団を調製しようとしても、誘導効率の低いiPS細胞株も存在し、特に角膜上皮細胞に関しては、より短期に安定生産できる技術への改良が求められていた。そこで、本発明者らは、多能性幹細胞から例えば、眼細胞発生に影響を与える因子として、ラミニンのアイソフォームに着目して検討を行ったところ、アイソフォームの違いにより得られる細胞集団における細胞構成が大きく変化する、即ち、アイソフォームの違いによって、多能性幹細胞から分化誘導される細胞原基や分化細胞の種類が異なることを見出した。かかる選択的な分化誘導が行われるメカニズムとしては、アイソフォームの多能性幹細胞との結合親和性の違いにより、細胞遊走、細胞骨格、接着又は浮遊状態などが変化して、アイソフォーム依存的な多能性幹細胞コロニーの極性が生じることで、分化に関する転写因子やシグナル伝達経路が変化することが判明した。次いで、これに伴って異なる細胞の自律的分化が制御され、さらにはアイソフォームと特異的に結合しやすいインテグリンサブユニットをもつ細胞原基や分化細胞が選択的に増殖することで、得られる細胞集団の細胞構成が変化すると考えられる。よって、例えば、同じ増殖因子が培地に添加されていたとしても、多能性幹細胞との結合親和性を指標にして選択したアイソフォームを用いることで選択的な分化誘導が行えると考えられる。また、上記のような原基が形成された後、該原基におけるイ

ンテグリンの種類に応じてアイソフォームを選択すると、増殖を選択的に更に促進することができると考えられる。ただし、これらの推測は、本発明を限定するものではない。

[0015] 本発明は、多能性幹細胞の分化を制御する方法を提供するものであって、多能性幹細胞から分化細胞に誘導する際に、所望する分化細胞の種類に応じて培養時に存在させるラミニン又はそのフラグメントの種類を選択することに特徴を有する。具体的には、所望する分化細胞の種類に応じて多能性幹細胞との結合親和性を指標として選択した特定のラミニン又はそのフラグメントの存在下に、多能性幹細胞を分化させることで、得られる細胞集団が、例えば、眼周囲細胞を誘導させる増殖因子として同じものを存在させていても、角膜上皮細胞を高含有する細胞集団であったり、神経堤細胞を高含有する細胞集団であったりと、使用するラミニン又はそのフラグメントによって分化の方向性を制御することができるものである。換言すると、選択するラミニン又はそのフラグメントによって、同じ多能性幹細胞から種々の分化細胞に作り分けることができるものである。よって、本発明の多能性幹細胞の分化制御方法とは、多能性幹細胞から分化細胞への選択的な分化誘導方法でもあり、分化細胞の選択方法、あるいは、目的細胞を高含有する細胞集団の製造方法でもある。ここで、特定細胞を高含有する細胞集団とは、用いるラミニン又はそのフラグメントが存在しない以外は同じ条件下で分化誘導した際に得られる細胞集団に比して、特定細胞の存在比率が高いものであればその程度は特に限定されない。

[0016] 本発明における多能性幹細胞とは、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞のことである。具体的には、例えば、胚性幹細胞（ES細胞）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（ntES細胞）、精子幹細胞（GS細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが挙げられる。好ましくは、ES細胞、ntES細胞及びiPS細胞であり、より好ましくはiPS細胞である。多能性幹細胞は、哺

乳動物の多能性幹細胞であることが好ましい。哺乳動物は特に限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ等が挙げられる。なかでもヒトが好ましい。ヒト多能性幹細胞を用いることにより、ヒトの再生医療に利用可能な安全な細胞種に応じた細胞集団を取得することができる。

[0017] ラミニンは、α鎖、β鎖及びγ鎖の３本のサブユニット鎖からなるヘテロ３量体分子である。α鎖はα１～α５の５種類、β鎖はβ１～β３の３種類、γ鎖はγ１～γ３の３種類が知られており、それらの組み合わせで少なくとも１２種類以上のアイソフォームが存在する（表１参照）。本発明で用いることができるラミニンとしては、いずれのアイソフォームであってもよく、所望する分化細胞に応じて、α１～α５から選択される１種のα鎖、β１～β３から選択される１種のβ鎖、γ１～γ３から選択される１種のγ鎖を適宜組み合わせたものを選択することができる。なお、本明細書において、例えば、α鎖がα１、β鎖がβ１、γ鎖がγ１であるアイソフォームのことを、ラミニン111と表記し、他のアイソフォームについても同様に表記することもある。

[0018] [表1]

α鎖	三量体組成
α１	α1β1γ1 (laminin-1)
	α1β2γ1 (laminin-3)
α２	α2β1γ1 (laminin-2)
	α2β2γ1 (laminin-4)
	α2β1γ3 (laminin-12)
α３	α3β3γ2 (laminin-5)
	α3β1γ1 (laminin-6)
	α3β2γ1 (laminin-7)
α４	α4β1γ1 (laminin-8)
	α4β2γ1 (laminin-9)
α５	α5β1γ1 (laminin-10)
	α5β2γ1 (laminin-11)

[0019] ラミニンの由来は特に限定されず、各種生物由来のラミニンを用いることができる。好ましくは哺乳動物由来のラミニンである。哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ等が挙げられるが、限定されな

い。また、用いる多能性幹細胞と同種のものが好ましく、例えば、ヒトの再生医療の材料を得るためにヒト幹細胞を培養する場合には、ヒト由来のラミニンを用いることが好ましい。

[0020] 本発明で用いることができるラミニンは全長であってもよく、そのフラグメントであってもよい。すなわち、全長α鎖、全長β鎖及び全長γ鎖からなる全長ラミニンであってもよく、α鎖、β鎖及びγ鎖の１つ以上が全長より短いフラグメントからなるラミニンフラグメントであってもよい。ただし、ラミニンフラグメントはヘテロ３量体を形成していることを要する。また、ラミニンフラグメントはインテグリン結合活性を有していることが好ましい。

[0021] ラミニンフラグメントとしては、例えば、前記したラミニンのE8フラグメントを用いることができる。ラミニンE8フラグメント（以下、「ラミニンE8」又は「E8」と記す）とは、マウスラミニン111をエラスターゼで消化して得られたヘテロ三量体を形成しているフラグメントであり、強い細胞接着活性をもつフラグメントとして同定されたものである（Edgar D et al., J. Cell Biol., 105:589-598, 1987）。マウスラミニン111以外のラミニンについてもエラスターゼで消化した際にマウスラミニン111E8に相当するフラグメントの存在が推定されるが、マウスラミニン111以外のラミニンをエラスターゼで消化してE8を分離、同定した報告はない。したがって、本発明に用いるラミニンE8は、ラミニンのエラスターゼ消化産物であることを要するものではなく、マウスラミニン111E8と同様の細胞接着活性を有し、類似の構造を有するラミニンフラグメントであればよい。

[0022] ラミニンE8は、α鎖のC末端フラグメントから球状ドメイン4及び5が除かれたフラグメント（α鎖E8）、β鎖のC末端フラグメント（β鎖E8）及びγ鎖のC末端フラグメント（γ鎖E8）が三量体を形成したフラグメントである。三量体の分子量は特に限定されないが、通常約150～約170kDaである。γ鎖E8のC末端部から3番目のグルタミン酸残基はラミニンE8のインテグリン結合活性に必須である（Hiroyuki Ido et al., The Journal of Biological Chemistry,

282, 11144-11154, 2007）。

[0023] なお、ラミニン及びラミニンフラグメントが、ヘテロ３量体を形成していることやインテグリン結合活性を有していることは、公知の方法に従って確認することができる。例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供してバンド数を検出すること等によりヘテロ３量体であることを確認できる。また、例えば、ＥＬＩＳＡ法等によりインテグリン結合活性を確認することができる。

[0024] ラミニンは天然型であってもよく、その生物学的活性を維持したまま、１個又はそれ以上のアミノ酸残基が修飾された修飾型であってもよい。ラミニンフラグメントも同様である。ラミニンの製造方法は特に限定されず、例えば、ラミニン高発現細胞から精製する方法や、組換えタンパク質として製造する方法などが挙げられる。ラミニンフラグメントの製造方法も特に限定されず、例えば、全長ラミニンをエラスターゼ等のタンパク質分解酵素で消化し、目的のフラグメントを分取、精製する方法や、組換えタンパク質として製造する方法などが挙げられる。製造量、品質の均一性、製造コスト等の観点から、ラミニン及びラミニンフラグメントの両者とも、組換えタンパク質として製造することが好ましい。

[0025] 組換えラミニン、組換えラミニンフラグメントは、公知の遺伝子組換え技術を適宜用いることにより製造することができる。組換えラミニン、組換えラミニンフラグメントの製造方法としては、例えば、α鎖、β鎖及びγ鎖の各全長タンパク質をコードするDNA、または組換えラミニンフラグメントとして例えば組換えラミニンE8を製造する場合には各鎖のE8フラグメントをコードするDNAをそれぞれ取得し、これをそれぞれ発現ベクターに挿入し、得られた３種類の発現ベクターを適切な宿主細胞に共導入して発現させ、３量体を形成しているタンパク質を公知の方法で精製することにより製造することができる。組換えラミニン（全長）の製造方法としては、例えば井戸ら（Hiroyuki Ido et al., The Journal of Biological Chemistry, 279, 10946-10954, 2004）の方法などが挙げられるが、これに限定されない。組換えラミニンE8の製造方法としては、例えば井戸ら（Hiroyuki Ido et al., The Journal o

f Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007）の方法が挙げられるが、これに限定されない。

[0026] 主要な哺乳動物のラミニンを構成するα鎖、β鎖、γ鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報及び各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。表２に、ヒトのラミニンを構成する各鎖のアクセッション番号を示す。これら以外の各種生物のラミニン構成鎖の塩基配列情報及びアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。

[0027] [表2]

	アミノ酸配列	塩基配列
ヒトラミニンα１鎖	NP_005550	NM_005559
ヒトラミニンα２鎖	NP_000417	NM_000426
ヒトラミニンα３鎖	NP_000218	NM_000227
ヒトラミニンα４鎖	NP_002281	NM_002290
ヒトラミニンα５鎖	NP_005551	NM_005560
ヒトラミニンβ１鎖	NP_002282	NM_002291
ヒトラミニンβ２鎖	NP_002283	NM_002292
ヒトラミニンβ３鎖	NP_000219	NM_000228
ヒトラミニンγ１鎖	NP_002284	NM_002293
ヒトラミニンγ２鎖	NP_005553	NM_005562
ヒトラミニンγ３鎖	NP_006050	NM_006059

[0028] 本発明においては、前記したラミニン及びラミニンフラグメントからなる群より選ばれるものであれば、所望する分化細胞の種類に応じて多能性幹細胞との結合親和性を指標として選択したものを、単独で又は２種以上を組み合わせて用いることができる。即ち、本発明では、所望する分化細胞の種類に応じて、ラミニン及びラミニンフラグメントを選択するが、その選択指標として多能性幹細胞との結合親和性を用いる。本明細書において、細胞との結合親和性は、細胞生着率及び細胞の移動性を経時観察することで判断することができる。また、ＥＬＩＳＡ法等によりインテグリン結合活性を確認することで判断することができる。あるいは、参考文献１（Matrix Biol. 2006 Apr;25(3):189-97. Epub 2006 Jan 18.）には、ラミニンアイソフォームに対する組換えインテグリンの解離定数が掲載されており（表３参照）、それ

を参考にして判断することができる。例えば、以下に、参考文献１に基づいて、iPS細胞に発現するラミニン結合型インテグリンの解離乗数から結合親和性を判断したものを示す。下記表と対比することで、その他のラミニンアイソフォームの結合親和性を判断することができる。

[0029] [表3]

Kd(nM)	Laminin				
	111	211/221	332	411	511/521
α3β1	ND	ND(+)	14 ± 3	ND	3.4 ± 0.8
α6β1	9.5 ± 3.3	ND(+)	7.5 ± 2.7	ND(+)	0.73 ± 0.22
α6β4	ND	ND	12 ± 3	ND	25 ± 1
α7X1β1	ND(+)	0.64 ± 0.35	ND	ND(+)	1.2 ± 0.5
α7X2β1	0.97 ± 0.26	2.6 ± 0.7	ND	ND	ND(+)
多能性幹細胞に対する結合親和性	中	弱	中	弱（コーティング濃度が2倍でやや強）	強

＊ ND：Not Determined, ND(+)：測定限界レベル

[0030] 上記のようにして判断された結合親和性に基づいて、中枢神経、網膜細胞のような分化細胞を得る場合には、多能性幹細胞との結合親和性が強いアイソフォームを選択すればよく、角膜上皮細胞、表皮細胞、水晶体上皮細胞のような上皮細胞を得る場合には、多能性幹細胞との結合親和性が中程度のアイソフォームを選択すればよく、神経細胞、神経堤細胞のような分化細胞を得る場合には、多能性幹細胞との結合親和性が弱いアイソフォームを選択すればよい。このように所望の分化細胞が決まっていれば、用いるラミニン又はラミニンフラグメントの種類を決定することができ、かくして選択されたラミニン又はラミニンフラグメントの存在下に、多能性幹細胞を培養することで所望の細胞や細胞原基が形成される。

[0031] 多能性幹細胞の分化誘導方法としては、前記したラミニン又はそのフラグメントの存在下に分化誘導できるのであれば、公知の方法から適宜選択して用いることができる。例えば、本発明者らが開発した多能性幹細胞を眼周囲細胞へ分化誘導する方法（非特許文献１）を好適に用いることができる。具体的には、例えば、培養用シャーレ等の培養器の培養面に前記したラミニン

又はラミニンフラグメントをコーティングし、そこにヒトiPS細胞を播種して、数日間コロニー形成させた後、KnockOut血清代替を含む培地で培養後、ヒトケラチノサイト成長因子（Keratinocyte Growth Factor: KGF）及びヒト繊維芽細胞成長因子－２（Fibroblast Growth Factor-2: FGF-2）を含む培地で培養する方法である。ここで、コロニーを形成させる培養のことを「コロニー形成培養」、それ以降の培養のことを「分化培養」又は「分化誘導」と記載することもある。また、例えばビーズ等の担体にラミニン又はラミニンフラグメントをコーティングし、この担体を細胞懸濁液に投入して培養する方法が挙げられる。あるいは、ラミニン又はラミニンフラグメントをそのまま培養液に添加して培養する方法も挙げられる。なお、本発明において、培地を交換する際に存在させるラミニン又はそのフラグメントは、その量や種類は同一であっても異なるものでもあってもよい。

[0032] ラミニン又はラミニンフラグメントの使用濃度は、用いるラミニン又はラミニンフラグメントの種類によって、即ち、多能性幹細胞との結合親和性に応じて、目的が達成できる濃度を適宜選択して設定すればよい。例えば、ラミニン又はラミニンフラグメントをコーティングして存在させる場合は、約0.1～約10μg/cm^{2}の範囲から選択することができる。また、ラミニンE8をコーティングする場合は、約0.25～約2.0μg/cm^{2}であってもよく、約0.5～約1.5μg/cm^{2}であってもよく、約0.5～約1.0μg/cm^{2}であってもよい。培養液中に添加する場合も、使用する培養器材の面積に応じて前記コーティング時と同程度の量となるよう設定することができる。例えば、多能性幹細胞との結合親和性が強いものであっても低濃度で使用することで、結合親和性を調整して分化誘導を制御することができる。なお、ラミニン又はラミニンフラグメントの器材への固定化方法（コーティング方法）としては、特に限定はないが、例えば、適当な緩衝液の中で固相と接触させることにより固定化することができる。

[0033] 本発明において使用される培地は、特に限定はなく、細胞培養に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、例えば市販の培

地を適宜選択して使用することができる。これらの培地はその本来の構成成分以外にその他の成分を含んでいても良い。

[0034] 具体的には、例えば、所望する分化細胞の種類に応じた増殖因子を含むことができる。増殖因子としては、公知技術に従って適宜選択することができ、例えば、KGF、FGF-2、BMP4などを例示することができる。

[0035] 培養開始時の細胞数としては、特に限定はないが、例えば好適には$10\sim1\times10^{8}$cells/mL、より好適には$1\times10^{2}\sim5\times10^{7}$cells/mL、更に好適には$1\times10^{3}\sim2\times10^{7}$cells/mLが例示される。また、接着培養の場合には、好適には10～2500cells/cm^{2}、より好適には100～1000cells/cm^{2}、更に好適には300～700cells/cm^{2}の範囲が例示される。培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、37℃、5%CO_2などの条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で細胞培養液を新鮮な培地を加えて希釈するか、培地を交換するか、もしくは細胞培養用器材を交換することができる。

[0036] 本発明において用いることができる細胞培養用器材としては、特に限定はないが、例えば、シャーレ（プレート）、フラスコ、バッグ、大型培養槽、バイオリアクターなどを使用することができる。なお、バッグとしては、細胞培養用CO_2ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量の細胞集団を製造する場合には、大型培養槽を使用することができる。また、培養は開放系、閉鎖系のいずれでも実施することができるが、好適には得られる細胞集団の安全性の観点から閉鎖系で培養を行うことが好ましい。

[0037] ラミニン又はラミニンフラグメントの存在下に多能性幹細胞を培養する時間としては特に限定されず、用いたラミニン又はラミニンフラグメントの種類やその量に応じて目的が達成できる時間を適宜選択すればよい。また、培養時間中のラミニン又はラミニンフラグメントが存在する時間は、培養期間の全期間であってもよく、任意の一部の期間であってもよい。好適には、全培養期間中の少なくとも初期段階において、好ましくは培養開始時に、ラミニン又はラミニンフラグメントの存在下に培養を実施していればよい。

[0038] また、本発明においては、多能性幹細胞を前記したラミニン又はラミニンフラグメントの存在下に培養し細胞原基を得てから、かかる原基が形成された後、該原基におけるインテグリンの種類に応じてアイソフォームを選択することで、増殖を選択的に促すことができる。本発明はかかる態様の分化誘導も含むものである。具体的には、例えば、神経堤細胞の場合はラミニン211又はそのフラグメント、上皮細胞の場合はラミニン332又はそのフラグメント、網膜細胞や神経堤細胞の場合はラミニン411又はそのフラグメントを用いて細胞原基を培養して誘導することができる。

[0039] 本発明においては、必要に応じて、ラミニン又はラミニンフラグメント以外のその他の成分を添加して培養を行ってもよい。その他の成分としては、例えば、ビトロネクチン、フィブロネクチン、コラーゲン、マトリゲル、ゼラチン、ポリ-L-リジンなどを挙げることができる。

[0040] また、前記以外にも、所望する分化細胞の種類に応じて、例えば、神経堤細胞の分化誘導を促進させる場合、Wntシグナル経路促進剤を添加してもよい。

[0041] かくして、多能性幹細胞を所望する細胞に応じたラミニン又はラミニンフラグメントの存在下に分化誘導して所望の細胞集団を選択的に得ることができる。

[0042] 分化誘導される細胞としては、特に限定されず、多能性幹細胞から分化誘導可能な全ての体細胞を例示することができる。具体的には、例えば、外胚葉由来の細胞としては、角膜細胞、ドーパミン産生神経細胞、運動神経細胞、末梢神経細胞、色素上皮細胞、皮膚細胞、内耳細胞などが挙げられる。内胚葉由来の細胞としては、肝細胞、膵前駆細胞、インスリン産生細胞、胆管細胞、肺胞上皮細胞、腸管上皮細胞などが挙げられる。中胚葉由来の細胞としては、心筋細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、血液細胞、骨細胞、軟骨細胞、腎前駆細胞、腎上皮細胞などが挙げられる。なお体細胞には最終分化した成熟細胞だけでなく、最終分化に至っていない分化途中の細胞も含まれる。

[0043] 得られた細胞集団における目的の細胞の存在比率は、用いたラミニン又はラミニンフラグメントの種類や培養条件に応じて一概に規定することはできない。

[0044] また、得られた細胞集団から目的の細胞を回収する方法としては、特に限定されない。ラミニン又はラミニンフラグメントに接着していない細胞（非接着細胞）を回収する方法としては、例えば、ラミニン又はラミニンフラグメントをコーティングした培養器を用いた場合は、回収した培地及びコーティング表面をPBS等で数回洗浄した洗浄液に含まれる細胞を遠心分離等により回収することができる。ラミニン又はラミニンフラグメントをコーティングした担体を細胞懸濁液に投入した場合には、担体を回収した細胞懸濁液に残っている細胞を遠心分離等により回収することができる。

[0045] ラミニン又はラミニンフラグメントに接着した細胞（接着細胞）を回収する方法は特に限定されず、接着細胞を剥離する公知の方法を適宜選択して用いることができる。ラミニン又はラミニンフラグメントをコーティングした培養器を用いた場合には、例えば、非接着細胞を除去した後、ラミニン又はラミニンフラグメントのコーティング面にEDTA液、トリプシン液等の公知の細胞剥離用溶液を添加してピペッティング等をすることにより細胞を剥離させ、回収することができる。ラミニン又はラミニンフラグメントをコーティングした担体を用いた場合には、細胞剥離用溶液に担体を投入してピペッティング等をすることにより細胞を剥離させ、回収することができる。

[0046] このように、本発明の多能性幹細胞の分化制御方法により、多能性幹細胞から所望の細胞への分化誘導を、用いるラミニンの種類によってコントロールすることが可能となり、所望の細胞を高比率で含有する細胞集団が得られるという優れた効果が奏される。また、多能性幹細胞から所望の細胞が直接得られることから、非特許文献１の方法に比べて、工程数が少なく、生産性の高い方法であるとも言える。また、ラミニンはインテグリンを介して細胞のアポトーシスを抑制して細胞の生存を維持するとともに、細胞増殖を促す細胞内シグナル伝達経路を活性化することが知られている（Gu J et al. The

Journal of Biological Chemistry 277:19922-19928, 2002）。したがって、本発明においては、ラミニン又はラミニンフラグメントの存在下に細胞を分化誘導するため、高いバイアビリティーを維持した状態の細胞集団を得ることができるという大きな利点も有する。

[0047] 以下に、例えば、眼周囲細胞を選択的に分化誘導する方法について説明する。具体的には、例えば、ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメントを用いる例である。なお、培養条件は用いるラミニン又はラミニンフラグメントの種類が異なる以外は、いずれの場合も同じであり、前出を参照することができる。

[0048] ラミニン111とはα鎖がα１、β鎖がβ１、γ鎖がγ１であるアイソフォームであり、「ラミニン１」、「ラミニンα１β１γ１」と表記されることもある。ラミニン111は胎児組織の基底膜発現することが知られているが、ラミニン111又はそのE8フラグメントを用いた場合は、神経細胞、神経網膜、水晶体上皮細胞を好適に誘導することができる。

[0049] ラミニン211とはα鎖がα２、β鎖がβ１、γ鎖がγ１であるアイソフォームであり、「ラミニン２」、「ラミニンα２β１γ１」と表記されることもある。ラミニン211は筋組織や神経組織の基底膜に特異的に発現することが知られているが、ラミニン211又はそのE8フラグメントを用いた場合は、神経細胞、神経堤細胞を好適に誘導することができる。ラミニン211又はそのE8フラグメントは、多能性幹細胞との結合親和性が非常に弱いが、生着可能なため、神経細胞誘導に用いられる浮遊培養に限りなく近い状態で接着培養することができる。それによって、Wntシグナルが活性化し、神経細胞や接着して細胞遊走を行う神経堤細胞に分化すると考えられる。またその際に、Wntシグナル経路促進剤を存在させることで、神経堤細胞への分化がより促進すると考えられる。このような神経細胞、神経堤細胞への分化を促進するラミニン２１１上のiPS細胞では、VinculinＹ８２２のリン酸化が亢進し、細胞間接着が優位になっている。

[0050] ラミニン332とはα鎖がα３、β鎖がβ２、γ鎖がγ２であるアイソフォームであり、「ラミニン５」、「ラミニンα３β３γ２」と表記されることもある。ラミニン332は皮膚などの重層上皮組織の基底膜に特異的に発現することが知られている。ラミニン332は多能性幹細胞がよく生着するためコロニー形成培養に使用できるが、コロニー形成の際に、その適度な結合の強さにより、細胞の集団運動が活発な状態にてコロニー形成が起こるため細胞の密度は相対的に低くなる。それにより、神経外胚葉への分化を促進する経路の活性化が起きにくく、表面外胚葉への分化がしやすくなる。また、分化した神経や神経網膜等の細胞との結合親和性が低く、上皮細胞との親和性が高いことから、上皮細胞、なかでも角膜上皮細胞を好適に誘導することができると考えられる。

[0051] ラミニン411とはα鎖がα４、β鎖がβ１、γ鎖がγ１であるアイソフォームであり、「ラミニン８」、「ラミニンα４β１γ１」と表記されることもある。ラミニン411は血管内皮等の基底膜に特異的に発現することが知られているが、ラミニン411又はそのE8フラグメントを用いた場合は、神経網膜細胞や神経堤細胞等を好適に誘導することができる。高濃度存在下ではラミニン511と同様に、多能性幹細胞との結合の強さから、細胞の集団運動が起きにくく、コロニー内の細胞密度が相対的に高くなり、コロニーの中央部で神経外胚葉への分化を促進する経路が活性化し、神経外胚葉系譜への分化が起きやすい。一方、上皮細胞との結合親和性よりも神経堤細胞や網膜細胞との結合親和性が高いため、その後の網膜の増殖が促進されると考えられる。

[0052] ラミニン511とはα鎖がα５、β鎖がβ１、γ鎖がγ１であるアイソフォームであり、「ラミニン１０」、「ラミニンα５β１γ１」と表記されることもある。ラミニン511は腎臓、肺、膵臓、血管等の基底膜に特異的に発現することが知られているが、ラミニン511又はそのE8フラグメントを用いた場合は、神経、網膜、上皮細胞等をバランスよく誘導することができることが知られている。しかしながら、より高濃度になると、多能性幹細胞との結合の強さから、細胞の集団運動が起きにくく、コロニー内、中でもコロニー中央部

にかけて細胞密度が相対的に高くなり、コロニーの中央部で神経外胚葉への分化を促進する経路が活性化し、神経外胚葉系譜への分化が起きやすい。一方、低濃度にすることで、細胞の集団運動を促し、上皮細胞を好適に誘導することも可能である。また、高濃度では、MLCのリン酸化も認められてコロニー外周に収縮がかかりやすい。

[0053] このように、ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメントを用いることで、同じ眼周囲細胞であっても、種類が異なる細胞を高含有する細胞集団をそれぞれ製造することができる。

[0054] よって、本発明はまた、前記本発明の多能性幹細胞の分化制御方法を用いて、下記からなる群より選択される眼周囲細胞を含有する少なくとも１つの細胞集団を製造する方法を提供する。

細胞集団（１）：網膜細胞含有率が高い細胞集団

細胞集団（２）：神経堤細胞含有率が高い細胞集団

細胞集団（３）：神経細胞含有率が高い細胞集団

細胞集団（４）：角膜上皮細胞含有率が高い細胞集団

[0055] 本発明の細胞集団の製造方法としては、本発明の多能性幹細胞の分化制御方法を行うのであれば、特に限定されない。例えば、多能性幹細胞をラミニン332又はラミニン332E8の存在下で培養することで、角膜上皮細胞含有率が高い細胞集団を製造することができる。なお、培養の具体的な操作や条件などについては、本発明の分化制御方法の項を参照することができる。

[0056] また、ラミニン332又はラミニン332E8を用いた場合は、多能性幹細胞との適度な結合の強さにより、細胞の集団運動が起きやすくコロニー形成過程において細胞密度が相対的に低くなるため、Hippo経路は活性化しにくく、角膜上皮や表皮の原基となる表面外胚葉が分化しやすくなる。多能性幹細胞との結合性が強いラミニン又はラミニンフラグメントを用いた場合、例えば、非特許文献１に記載のラミニン511E8を用いた場合と比較すると、上皮細胞への分化誘導が促進されて分化誘導に要する期間を半減できるという効果も得ら

れる。また更に、分化誘導が促進されることによって得られる細胞における未分化状態の細胞や造腫瘍性のある細胞の比率が少なくなるため、より好ましい。よって、本発明の製造方法により、生産性高く、角膜上皮細胞を製造することができるという優れた効果も奏される。

[0057] 本発明の製造方法により製造した細胞集団は、例えば、細胞集団（４）はそのまま培養すれば移植用角膜上皮細胞シートを作製することができる高純度の角膜上皮細胞集団である。ここで、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」とは、少なくとも一眼（片眼）用の角膜上皮細胞シートの作製に必要な1×10^5個以上の細胞で構成される細胞集団であることを要する。ただし、本願発明の産業上利用を考慮すれば、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」は複数眼用の角膜上皮細胞シートの作製に必要な細胞数を有することが望ましい。したがって、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」を構成する細胞数は、2×10^5cells以上、4×10^5cells以上、6×10^5cells以上、8×10^5cells以上、1×10^6cells以上であることが好ましい。また、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」は、不純細胞の含有率が50％未満であることが好ましく、45％未満、40％未満、35％未満、30％未満であることが好ましい。

[0058] 移植用角膜上皮細胞シートは、本発明の製造方法により製造した細胞集団を、6ウェルプレートを用いる場合は1.5×10^5～6.0×10^5cells/wellで播種し、12ウェルプレートを用いる場合は0.5×10^5～1.0×10^5cells/wellで播種して、コンフルエントになるまで5～12日間培養することにより作製することができる。

[0059] 本発明の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団は、そのまま移植用角膜上皮細胞シートの製造原料として使用することができる。したがって、本願発明には、本発明の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団を培養する工程を含む移植用角膜上皮細胞シートの製造方法が含まれる。本発明の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団から移植用角膜上皮細胞シート

を製造するための方法は特に限定されない。例えば、本発明の製造方法により製造した細胞集団を、6ウェルプレートを用いる場合は1.5×10^5～6.0×10^5cells/wellで播種し、12ウェルプレートを用いる場合は0.5×10^5～1.0×10^5cells/wellで播種して、コンフルエントになるまで5～12日間培養することにより作製することができる。培地交換は2日に1回の割合で行うことが好ましい。プレートには通常の細胞培養用プレートを用いることができる。また、細胞シート回収用温度応答性細胞培養（セルシード社製「Up Cell（商品名）」）を用いてもよい。

[0060] また、本発明の製造方法により製造された細胞集団は、特定細胞を高比率で含有することから、例えば、眼疾患の治療剤の薬効評価や発症メカニズムの解析などに大きな貢献をもたらすことができる。

[0061] また、本発明は、ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのフラグメントを含有する、多能性幹細胞の分化制御剤を提供する。本発明の分化制御剤は、多能性幹細胞を前記ラミニン又はラミニンフラグメントを用いることで所望の細胞に選択的に誘導できる。詳細は、本発明の分化制御方法の項を参照することができる。

実施例

[0062] 以下、実施例によって本発明を詳述するが、これらの実施例は本発明の一例であり、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以降において、室温とは25℃を示す。

[0063] 実施例１　眼周囲細胞への分化誘導

iPS細胞から眼周囲細胞の分化誘導には、self-formed ectodermal autonomous multi-zone (SEAM) 法を用いた（Hayashi et al. Nature. 2016 Mar 17; 531(7594):376-80.）。分化誘導の工程概略を図１に示す。なお、用いたラミニンアイソフォームは、ラミニン111のE8フラグメント(ラミニン111E8)、ラミニン211のE8フラグメント(ラミニン211E8)、ラミニン332のE8フラグメント(ラミニン332E8)、ラミニン411のE8フラグメント(ラミニン411E8)及びラミニ

ン511のE8フラグメント(ラミニン511E8)であり、いずれも公知技術に従って調製したものである。

[0064] 具体的には、各ラミニンアイソフォームのE8断片にて0.5～1.0μg/cm²濃度でコーティングしたプレートに、ヒトiPS細胞株（201B7）を300～700cells/cm²の密度で播種し、8～10日間、StemFit(登録商標)培地(味の素)で培養後、分化培地（DM; 10% knockout serum replacement(KSR, Life Technologies)、1mM sodium pyruvate(Life Technologies)、0.1mM non-essential amino acids(Life Technologies)、2mM l-glutamine(Life Technologies)、1% penicillin-streptomycin solution(Life Technologies)及び55μM 2-mercaptoethanol(Life Technologies)を含有させたGMEM培地(Life Technologies)）にて４週間培養した。次いで、角膜分化培地（CDM; 20ng/mL KGF(Wako)、10μM Y-27632(Wako)及び1% penicillin-streptomycin solutionを含有させたDM培地とCnt-20又はCnt-PR培地(EGF及びFGF2不含有、CellnTEC Advanced Cell Systems）の1:1(v/v)混合培地）にて４週間培養した後、角膜上皮維持培地（CEM; 2% B27 supplement(Life Technologies)、1% penicillin-streptomycin solution、20ng/mL KGF、10μM Y-27632を含有させたDMEM/F-12(2:1(v/v))培地(Life Technologies)）に交換後さらに２～５週培養して分化誘導した。なお、ラミニン511E8を用いたサンプルは、非特許文献１と同様にして分化誘導した例である。

[0065] 各ラミニンアイソフォームについて、分化誘導過程の細胞形態の位相差図をAxio Observer.D1 (Carl Zeiss)にて取得した。結果を図２に示す。なお、図中、「111」はラミニン111E8を、「211」はラミニン211E8、「332」はラミニン332E8を、「411」はラミニン411E8を、「511」はラミニン511E8を用いた例であり、以降の実施例においても、同様に表記した。

[0066] 図２より、非特許文献１における「511」を用いた場合に形成されるSEAMは、第１層(図中の1st)、第２層(図中の2nd)、第３層(図中の3rd)、第４層(図中の4th)から成る４層構造となり、それぞれが、中枢神経、網膜、角膜上皮、角膜以外の上皮細胞を構成するものであった。一方、「111」を用いると、

第１・第２層(1st/2nd)、「211」を用いると第１層(1st)、「332」を用いると第３・４層(3rd/4th)が６週後には誘導されていることが分かる。また、「411」を用いると「511」を用いた構造に似ているが、第３・４層(3rd/4th)が形成されないものであり「511」とは異なるものであった。以上より、アイソフォームにより多様な眼周囲細胞が分化する多能性幹細胞から眼細胞への分化誘導に対して、アイソフォームを用いることで、特定の層を選択的に誘導することができた。

[0067] 実施例２　分化誘導細胞におけるマーカータンパク質の発現

実施例１と同様の方法で分化誘導し、開始から適切な期間培養した細胞を、培養液を除去し、PBSで洗浄した後、4% paraformaldehyde/PBS又は冷メタノールにて固定した。次いで、TBSで3回洗浄し、5%ロバ正常血清及び0.3%Triton-X100含有TBSで室温にて1時間ブロッキングした後、一次抗体を加え室温で1時間又は4℃で一晩反応させた。その後、TBSで3回洗浄した後、二次抗体を加え室温で1時間反応させた。なお、一次抗体として、神経堤細胞の検出には、抗p75抗体（Mouse monoclonal; ME20.4、ADVANCED TRGETING SYSTEMS）及び抗SOX10抗体（Goat polyclonal; N-20、Santa Cruz Biotechnology）を用いた。神経細胞の検出には、抗TUBB3抗体（Rabbit polyclonal; T2200、Sigma-Aldrich）を用いた。上皮細胞及び網膜細胞の検出には、それぞれ、抗E-cadherin抗体（Mouse monoclonal; 180215、R&D systems）及び抗CHX10抗体（Goat polyclonal; N-18、Santa Cruz Biotechnology）を用いた。角膜上皮細胞の検出には、抗PAX6抗体（Rabbit polyclonal; ab97866、Abcam）及び抗p63抗体（Mouse monoclonal; 4A4、Santa Cruz Biotechnology）を用いた。二次抗体には，Alexa Fluor(登録商標)488、567又は647標識抗マウス、ウサギ又はヒツジIgG抗体（Invitrogen）を使用した。抗体はいずれも1%ロバ正常血清及び0.3%Triton-X100含有TBSで希釈して使用した。核の染色は、100倍希釈濃度のHoechst 33342で室温にて10分間処理をすることで行った。観察にはAxio Observer.D1（Carl Zeiss）を使用した。結果を図３に示す。

[0068] 神経堤細胞はp75/SOX10共陽性細胞として定義できる。培養２週目において

は、「511」上では球状のp75/SOX10共陽性細胞が検出されるが、その他アイソフォームでもp75/SOX10共陽性の神経堤細胞が検出できた。特に「211」を用いると神経堤細胞の拡大及び遊走が促進された。また、「511」を用いた従来の方法では培養４週目においては、p75/SOX10共陽性の神経堤細胞は消失するが、「211」では引き続き検出された。

[0069] 神経細胞のマーカーTUBB3は、対照の「511」上では、第１層、第２層においてその発現が確認された。また、「111」、「211」上では陽性細胞が線維を形成しているものであった。「411」ではTUBB3陽性の第２層目が「511」と比較して拡大していた。一方、「332」ではTUBB3陽性の神経細胞の出現が認められなかった。

[0070] 神経網膜のマーカーCHX10は、対照の「511」では第２層にその発現が認められるが、「411」ではCHX10陽性の神経網膜細胞が大きく拡大していた。その他のアイソフォームでは神経網膜の発現を認めなかった。一方、上皮マーカーのE-cadherinは、対照の「511」では３層目より外側で認められるが、「332」ではE-cadherin陽性の上皮細胞が大きく拡大していた。「111」や「211」ではE-cadherin陽性細胞は少なかった。

[0071] 角膜上皮細胞はPAX6/p63共陽性細胞として定義できる。「332」を用いることで、PAX6/p63共陽性細胞の角膜上皮細胞の分化が拡大していることが認められた。

[0072] 以上により、「111」は神経細胞、「211」は神経細胞及び神経堤細胞、「332」は角膜上皮細胞やその他上皮細胞、「411」は網膜細胞の分化をそれぞれ特異的に促進させた。

[0073] 実施例３　分化細胞の経時的遺伝子発現解析

実施例１と同様の方法で分化誘導し、分化培養の開始直前（０週）、４、６、１２週後の細胞について、培養液を除去し、PBSで洗浄した後、QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を用いて精製し、総量20μLの反応系にて，SuperScript(登録商標) III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) により逆転写を行い、作製したcDNAを鋳型に用いて、ABI Prism 7500

Fast Sequence Detection System(Life Technologies)により定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）を行った。結果を図４に示す。

[0074] 神経マーカーのSOX2の遺伝子発現は「332」を用いた場合に低下した。神経堤マーカーのSOX10及びp75は第４週において「211」を用いた場合にその遺伝子発現が上昇したが、眼の主要な転写因子であるPAX6の発現は低かった。網膜のマーカーであるRAX、VSX2は「411」及び「511」を用いた場合に高かった。上皮細胞マーカーのE-cadherin(Ecad)、TP63、K14は「332」で高かった。以上により、実施例２の定性的なアイソフォームによる分化の方向転換が、定量的に確認された。

[0075] 実施例４　iPS細胞のコロニー形成過程のタイムラプス解析

「332」又は「511」（共に0.5μg/cm^2）でコーティングした培養容器に、iPS細胞を播種し、IncuCyte(登録商標) Live Cell Analysis System (Essen BioScience) にてタイムラプス撮影後の各培養日数の位相差像を取得した。結果を図５に示す。

[0076] iPS細胞は、「332」上では放射状に細胞集団運動が頻繁に起き、面積の広いコロニーを形成したのに対して、「511」上では集団運動が起きにくく、密度の高いコロニーを形成することが確認された。

[0077] 実施例５　iPS細胞のコロニーにおけるHippo経路に関与する転写共役因子YAPの局在と神経外胚葉分化との関係

「332」又は「511」（いずれも0.5μg/cm^2）でコーティングした培養容器にiPS細胞を播種し、10日間StemFit(登録商標)培地（味の素）で培養後の細胞又は10日間のStemFit(登録商標)培地で培養後に実施例１で用いた分化培地(DM)と同じ培地に交換して３日間培養した細胞を、培養液を除去した後、TBSで洗浄し、4% paraformaldehyde/PBS又は冷メタノールにて固定した。次いで、TBSで洗浄後、膜透過処理のため、1% NST/TBS（1% normal donkey serum、0.3% Triton-X100）に交換後、4℃で一晩静置した。更に、5%ロバ正常血清及び0.3%Triton-X100含有TBSで室温にて1時間ブロッキングした後、一次抗体を加え室温で1時間又は4℃で一晩反応させた。その後、PBSで3回洗浄し

た後、二次抗体を加え室温で1時間反応させた。一次抗体は、抗YAP抗体（Mouse monoclonal; 63.7、Santa Cruz Biotechnology）及び抗N-cadherin抗体（Rabbit monoclonal; EPR1791-4、Abcam）を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor(登録商標)488又は594標識の抗マウス又はウサギIgG抗体（Invitrogen）を使用した。抗体はいずれも1% NST/TBSで希釈して使用した。核の染色は、Hoechst 33342で室温にて10分間処理をすることで行った。観察にはAxio Observer.D1（Carl Zeiss）を使用した。結果を図６に示す。左がiPS細胞培養10日後のYAPの染色結果、右が分化培養３日後のもので上段がYAPの染色結果、中段がN-cadherinの染色結果、下段が両者を重ねた結果である。

[0078] iPS細胞を「511」上で培養すると、コロニーの外周はYAPが核内に局在したのに対し、密度の高いコロニー中央部はYAPが核外に局在し、Hippoシグナルが活性化していることが示唆された。分化培地に交換後３日培養するとコロニー中央部のYAPが核外に局在する領域、すなわちHippo経路活性化領域のみで神経外胚葉分化を示すN-cadherin陽性細胞分化が起きた。一方、「332」を用いてiPS細胞コロニーの密度を小さくすることで、コロニーの全域において、YAPを核内に局在させる、すなわちHippo経路を不活化させることで、N-cadherin陽性の神経外胚葉への分化を阻害し、のちの角膜上皮の前駆にあたる表面外胚葉細胞への分化を促進することができた。

[0079] 実施例６　分化誘導した細胞の角膜上皮マーカー陽性率の解析

「111」、「211」、「332」、「411」又は「511」（いずれも0.5μg/cm^2）でコーティングした培養容器にiPS細胞を播種し、実施例１と同様の方法で分化誘導した細胞を、Accutase (Life Technologies)にて処理後、KCM培地（5% FBS(Japan Bio Serum)、0.4μg/mL hydrocortisone succinate(Wako)、2nM 3,3′,5-Triiodo-l-thyronine sodium salt (MP biomedicals)、1nM cholera toxin(List Biological Laboratory)、2.25μg/mL 1 bovine transferrin HOLO form(Life Technologies)、2mM l-glutamine、0.5% insulin transferrin selenium solution(Life Technologies)、1% penicillin-streptomycinを含有させたDMEM without glutamine/Nutrient Mixture F-12 Ham培地(3:1

(v/v)、Life Technologies)) に再懸濁し、セルストレイナー(40μm、BD Biosciences)を通過させた後、抗SSEA-4抗体(MC813-70、Biolegend)、CD104抗体(ITGB4; 58XB4、Biolegend又は624024、BD Pharmingen)及びCD200抗体(624052、BD Pharmingen) にて氷上にて1時間染色後、PBSにて洗浄後、セルソーターSH800 (SONY) 又はFACS Verse (BD Biosciences) にて解析を行った。データ解析にはFlowJo (TreeStar) を用いた。結果を図７に示す。

[0080] 角膜上皮（前駆）細胞は非特許文献１によりSSEA4/ITGB4共陽性細胞と定義できるが、「332」を用いることで、SSEA4/ITGB4共陽性細胞の割合を、「511」を用いた場合と比較して３倍程度上昇させることができた。また、「511」を用いた場合には、手動のピペッティング操作によって第１層と第２層を物理的に除去する行程が必要になるが、再生医療への応用を想定した場合、労力がかかり、ヒューマンエラーに繋がるおそれがある。一方で、「332」を用いることで、ピペッティングによる非上皮細胞の除去という操作を省略することが可能になり、より有効であることが示唆される。

[0081] 実施例７　分化誘導過程における未分化マーカーの遺伝子発現解析と分化誘導６週におけるiPS細胞由来角膜上皮細胞シートの評価

「332」又は「511」（いずれも0.5μg/cm^2）でコーティングした培養容器にiPS細胞を播種し、実施例１と同様の方法で分化誘導後４、６、１２週後の細胞中の未分化マーカーLIN28Aの遺伝子発現を実施例３に記載の方法にて解析した。

[0082] また、同様に６週後の分化細胞から実施例６に記載の抗体で染色後、非特許文献１に記載のSSEA4、ITGB4共陽性細胞をセルソーターSH800 (SONY) にてソーティングし、セルカルチャーインサート (BD Falcon) に播種し、CEM培地で３週間培養後、メスでメンブレンごと切り抜きＯＣＴcompundにて包埋・凍結後、クリオスタット（ライカ社）を用いて切片を作製した。切片作成後、風乾し、5%ロバ正常血清及び0.3%Triton-X100含有TBSで室温にて1時間ブロッキングした後、一次抗体を加え室温で1時間又は4℃で一晩反応させた。その後、TBSで3回洗浄した後、二次抗体を加え室温で1時間反応させた。一次

抗体には、抗PAX6抗体（Rabbit polyclonal; ab97866、Abcam）及び抗K12抗体（Goat polyclonal; N-16、Santa Cruz Biotechnology）を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor(登録商標)488又は567標識抗マウス又はウサギIgG抗体（Invitrogen）を使用した。抗体はいずれも1%ロバ正常血清及び0.3%Triton-X100含有TBSで希釈して使用した。核の染色は、100倍希釈濃度のHoechst 33342で室温にて10分間処理をすることで行った。観察にはAxio Observer.D1（Carl Zeiss）を使用した。結果を図８に示す。

[0083] iPS細胞由来分化細胞の臨床応用を想定した場合には、未分化細胞の混入による造腫瘍性の問題が懸念されるが、未分化マーカーの混入に対してはLIN28Aが有用なマーカーであることが報告されている。「332」を用いることで、分化誘導の各段階において分化マーカーLIN28Aの発現量を「511」に比べていずれも２倍以上抑えることができた。また、通常角膜上皮シートを作製する際は、分化誘導を１２週間程度行い、そこからFACSにて角膜上皮細胞のみを単離するが、６週間の分化誘導細胞から作製したシートにおいて、「511」上で分化したものに関しては、角膜上皮マーカーであるPAX6、K12の発現が不十分であったのに対して、「332」上で分化誘導した細胞から採取して作製した角膜上皮シートはそれらのマーカーを十分に発現していた。以上により、「332」を用いることで、分化誘導の期間を半分の６週に短縮することができた。

[0084] 実施例８　各ラミニンアイソフォーム上での眼周囲細胞の細胞生存率

実施例１と同様の方法で「511」を用いてiPS細胞より分化誘導６週後に形成されたSEAM構造中の第１～４層の細胞をマニュアルピペッティングで回収後、StemPro(登録商標) Accutase(登録商標)（Thermo Fisher Scientific）にて解離又は実施例７に記載のFACS sortingにて単離したものを、同じ細胞数ずつ、「111」、「211」、「332」、「411」又は「511」（いずれも0.5μg/cm^2）でコーティングした細胞培養プレートに播種した。播種後の細胞はCDM培地にて６週間培養後、細胞数をCell Counting Kit-8（同仁化学）により測定し、「511」に対する相対細胞生存率として算出した。結果を図９に示す。

[0085] 「332」上では、１層目（神経）と２層目（網膜）の細胞があまり増えないのに対して、３層目（角膜上皮）、４層目（その他の上皮）の細胞の増殖が認められた。よって、「332」はSEAM構造中の３層目と４層目の細胞を特異的に増殖させることが示唆された。

[0086] 実施例９　各ラミニンアイソフォーム上での分化細胞の比率

実施例３において分化誘導細胞における遺伝子発現を検討したが、その際の発現量について詳細に対比を行った。具体的には、分化誘導４週目の神経堤マーカー遺伝子発現結果について、「211」上で分化誘導したものと「511」上で分化誘導したものを抽出した。また、同様に分化誘導１２週におけるN-cadherin遺伝子の「411」と「511」の発現解析結果を抽出した。更に、実施例６において定量した角膜上皮マーカー陽性率を対比した結果も抽出した。結果を図１０にまとめて示す。

[0087] 「211」上では「511」と比較して、分化誘導４週目における神経堤マーカーのSOX10が約17倍、p75が約２倍程度上昇した。また、「411」上では網膜（CHX10陽性細胞）領域が拡大することを既に図３で示したが、N-cadherinの発現比は1.25倍程度に上昇し、上皮細胞の占める割合に対して、網膜細胞の占める割合が「411」上で高くなっていることを示した。一方、「332」上で分化誘導することにより、角膜上皮マーカー陽性細胞の割合が「511」と比して２倍以上高くなっていた。

[0088] 実施例１０　Wntシグナルターゲット遺伝子の発現解析

「111」、「211」、「332」、「411」又は「511」（いずれも0.5μg/cm^2）でコーティングした培養容器にiPS細胞を播種し、実施例１と同様の方法で分化誘導３日目のiPS由来細胞のWntシグナルの標的遺伝子の発現解析を行った。結果を図１１に示す。

[0089] 「211」上で分化誘導することにより、Wntシグナルの標的遺伝子である、AXIN2及びLEF-1の遺伝子発現が上昇した。したがって、「211」上では神経堤の分化を促すWntシグナルが他のアイソフォーム上での分化誘導と比べて、活性化していることが示唆された。

[0090] 実施例１１　ラミニンのコーティング濃度による分化調節

「511」のコーティング濃度を0.5、1.0、1.5(μg/cm²)にした状態で、実施例１と同様の方法で分化誘導を行い１２週後の遺伝子発現解析を行った。結果を図１２に示す。

[0091] 「511」のコーティング濃度依存的に重層上皮幹細胞マーカーTP63の遺伝子発現は低下し、一方、神経網膜マーカーVSX2の遺伝子発現は上昇した。以上より、iPS細胞との相互作用が強ければ強いほど、網膜の分化を促し、中程度であれば上皮化を促進することが示唆された。

[0092] 実施例１２　各ラミニンアイソフォームのコーティング濃度による角膜上皮細胞への分化誘導

「111」、「211」、「332」、「411」、「511」又は「VN」のコーティング濃度を0.5、1.0、1.5(μg/cm²)にした状態で、実施例１と同様の方法で分化誘導を行い、実施例６と同様にしてFACS解析にて、角膜上皮細胞画分を定量した。結果を図１３に示す。

[0093] 「332」を用いることで、角膜上皮細胞を各濃度において安定して高効率で誘導できた。また、「511」を用いた場合には、濃度が高くなると誘導効率が低下することが分かった。

[0094] 実施例１３　神経堤細胞マーカー遺伝子の発現解析

「111」、「211」、「332」、「411」又は「511」のコーティング濃度を0.5～1.0(μg/cm²)にした状態で、実施例１と同様の方法で分化誘導3日目のiPS由来細胞から、公知の方法に従ってRNAを回収した。得られたRNAは、RNeasy Plus micro kit (Qiagen) を用いて精製し、Sure Print G3 human 8×60K slides (Agilent Technologies、Palo Alto、CA、USA) を用いてマイクロアレイ解析を行い（タカラバイオ）、GeneSpring GX software (Agilent Technologies) を用いて、神経堤細胞マーカー遺伝子のヒートマップを作製した。結果を図１４に示す。

[0095] 「211」を用いた場合には、各種の神経堤マーカーの発現量が多い分化細胞が得られることから、「211」を用いることで神経堤細胞への分化制御が良好

に行えることが示される。

[0096] 実施例１４　神経堤細胞マーカーの発現解析

「211」のコーティング濃度を0.5～1.0(μg/cm²)にした状態で、実施例１と同様の方法で4週間分化誘導した細胞を、実施例２と同様の方法で抗体と反応させた。一次抗体には、抗PITX2抗体（Abcam、Ab55599）及び抗FOXC1抗体（Cell Signaling Technology、8758）を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor（登録商標）488、594標識抗マウス又はウサギIgG抗体（Invitrogen）を使用した。抗体はいずれも1% NST/TBS（1% normal donkey serum、0.3% Triton-X100含有TBS）で希釈して使用した。核の染色及び細胞の観察は、実施例２と同様にして行った。結果を図１５に示す。

[0097] 「211」上での分化誘導により、眼周囲神経堤マーカーPITX2、FOXC1陽性細胞が出現した。

[0098] 実施例１５　Wntシグナル経路関連遺伝子の発現解析

「111」、「211」、「332」、「411」又は「511」でコーティングした培養容器を用いて、実施例１３と同様にして、Wntシグナル経路関連遺伝子のヒートマップを作製した。結果を図１６に示す。

[0099] 「211」を用いた場合には、Wntシグナル経路関連遺伝子発現が上昇していることが示される。

[0100] 実施例１６　Wntシグナルと神経堤細胞への分化（その１）

「211」を1.0μg/cm²又は「511」を0.5μg/cm²でコーティングした培養容器を用いて、実施例１と同様の方法で2週間分化誘導する際に、最初の3日間Wntシグナル経路阻害剤であるIWP-2又はWntシグナル経路促進剤であるCHIR99021で処理を行い、実施例６と同様にしてFACS解析を行った。FACSは、CD271（p75、C40-1457; BD Pharmingen、Franklin Lakes、NJ、USA）とCD40d（ITGA4、9F10; BioLegend)に対する抗体を用いて行った。なお、各ControlにはDMSOを添加した系を用いた。結果を図１７に示す。なお、図中、上段には本実施例での分化誘導過程の概略図を示す。

[0101] 「211」上での分化誘導により、非常に高い割合で神経堤細胞が出現した（

43%）。しかし、Wnt阻害剤の添加により、「211」上での神経堤細胞分化は阻害された。一方、「511」上での分化誘導では、神経堤細胞の割合は0.35%に留まるが、Wnt促進剤で処理することで、その割合が6.2%に上昇した。したがって、Wntシグナル経路は神経堤細胞分化に重要であることが示された。

[0102] 実施例１７　Wntシグナルと神経堤細胞への分化（その２）

実施例１６で分化誘導された細胞について、p75抗体（ADVANCED TRGETING SYSTEMS、AB-N07）とSOX10抗体（Santa Cruz Biotechnology、sc-17342）を用いて、実施例２と同様にして免疫染色を行った。結果を図１８に示す。

[0103] 「211」上での分化誘導により、p75、SOX10共陽性の神経堤細胞が出現したが(DMSO)、Wnt阻害により共陽性細胞が減弱した(IWP)。一方、「511」上での分化誘導により、出現するp75、SOX10共陽性の神経堤細胞は、Wnt促進によりその出現が増加した(DMSOとCHIRの対比)。矢印はp75、SOX10共陽性の神経堤細胞を示す。

[0104] 実施例１８　MLC (Myosin light chain) のリン酸化解析

「211」を1.0μg/cm^2、「332」を0.5μg/cm^{2}又は「511」を0.5μg/cm^{2}でコーティングした培養容器を用いて、実施例１と同様の方法で3日間iPS細胞を培養し、固定後、Myosin light chain (phospo S20)抗体（Abcam、ab2480）を用いて、実施例２と同様にして免疫染色を行った。結果を図１９に示す。

[0105] 「511」上で、iPS細胞コロニーの外周部にMLCのリン酸化が認められ（図中の矢印部分）、コロニー外周に収縮がはたらいていることが示された。一方、ラミニン「211」上ではiPS細胞コロニー外周にかかる収縮の程度は弱いことが示された。

[0106] 実施例１９　MLCとVinculinのリン酸化解析

実施例と１８と同様にして10日間培養後のiPS細胞について、RIPA buffer（Thermo）で細胞抽出後、Pierce（登録商標）BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いてタンパク量を定量後、同タンパク量になるようにSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後は、iBlot system（Invitrogen、Waltham、MA、USA）を用いてメンブレンに転写し、p-MLC（ab2480、1:1000; Abcam

、Cambridge、UK）、p-Vinculin（V4889、1:1,000; Sigma-Aldrich）Vinculin（ab18058; Abcam）又はGAPDH（ab8245、1:5,000; Abcam）に対する一次抗体、horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG（ab6789、1:5,000; Abcam）又はanti-rabbit IgG（ab97051、1:5,000; Abcam）に対する二次抗体を用いて抗体反応を行った。ECL Prime reagent（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）を用いて検出し、ChemiDoc XRS+ imaging system（Bio-Rad、Hercules、CA、USA）を用いてスキャンした。結果を図２０に示す。

[0107] MLCのリン酸化は「511」で強く、「211」で弱かった。一方、細胞間接着を認識するVinculinのＹ８２２のリン酸化は「211」（J Cell Biol. 2014 Apr 28;205(2):251-63. doi: 10.1083/jcb.201309092. Epub 2014 Apr 21.）で特に強かった。以上のことより、「511」上ではiPS細胞に強い収縮がかかり、「211」では細胞間接着が優位になっていることが示された。

[0108] 実施例２０　iPSコロニー内の細胞密度

「332」を0.5μg/cm^{2}又は「511」を0.5μg/cm^{2}でコーティングした培養容器を用いて、実施例１と同様の方法で10日間培養したiPS細胞について、実施例２と同様にしてブロッキングと核染色を行って、細胞数をカウントし、1mm^{2}あたりの細胞密度を算出した。結果を図２１に示す。

[0109] 「511」上のiPSコロニーの中央部で細胞密度が最も高かった。

[0110] 実施例２１　YAP活性の違い

「332」を0.5μg/cm^{2}又は「511」を0.5μg/cm^{2}でコーティングした培養容器を用いて、実施例１と同様の方法で10日間培養したiPS細胞について、実施例３と同様にして遺伝子発現を解析した。結果を図２２に示す。

[0111] 「332」と比べて「511」上のiPS細胞はYAP標的遺伝子（CTGF、CYR61）の発現量が低いことから、「511」上ではYAPの活性が抑えられていることが示された。

[0112] 実施例２２　コロニーの凝縮と神経外胚葉分化

「511」を0.25～1μg/cm^{2}でコーティングした培養容器を用いて、実施例１と同様の方法で10日間培養したiPS細胞について、コロニーの直径をEVOS FL

Auto system (Life Technologies) にて定量した。また、前記とは別に、そのまま分化誘導させた分化3日目の細胞について、実施例２と同様にして免疫染色を行った。結果を図２３に示す。

[0113] 「511」のコーティング濃度に依存してiPS細胞コロニーは凝縮した。また、コロニーの凝縮により、PAX6はコーティング濃度依存的に発現が上昇した。したがって、「511」はコロニーの凝集と神経外胚葉分化を促進することが示された。

[0114] 実施例２３　YAP活性化と神経外胚葉分化

「511」を0.5μg/cm²でコーティングした培養容器を用いて、実施例１と同様の方法で10日間iPS細胞を培養後、Verteporfin (VP) 又はDMSOを添加した分化培地で3日間培養し、抗PAX6抗体 (BioLegend、PRB-278P) を用いて実施例２と同様にして免疫染色を行った。また、実施例２１と同様にして遺伝子発現も解析した。結果を図２４に示す。

[0115] YAP-TEAD阻害剤であるVP処理により、PAX6やRAXなど神経外胚葉マーカーの発現が上昇した。したがって、初期分化におけるYAPの不活化は神経外胚葉分化を促進することが示された。以上より、「511」はiPSコロニーを凝縮し、細胞密度を上昇させて、YAPの不活化を促すことで、神経外胚葉分化を促進することが示された。

産業上の利用可能性

[0116] 本発明により、分化誘導細胞の比率を任意に変化させた細胞集団を多能性幹細胞から簡便に製造することができる。当該製造方法により得られる細胞集団は、細胞医療による疾患の治療に極めて有用である。

請求の範囲

[請求項1] 多能性幹細胞との結合親和性を指標としてラミニン又はそのフラグメントを選択し、該ラミニン又はそのフラグメントの存在下に多能性幹細胞を分化誘導することを特徴とする、多能性幹細胞の分化制御方法。

[請求項2] ラミニン332又はラミニン332E8フラグメントの存在下に角膜上皮細胞への分化を制御する、請求項１記載の分化制御方法。

[請求項3] ラミニン111又はラミニン111E8フラグメントの存在下に神経細胞への分化を制御する、請求項１記載の分化制御方法。

[請求項4] ラミニン211又はラミニン211E8フラグメントの存在下に神経堤細胞への分化を制御する、請求項１記載の分化制御方法。

[請求項5] ラミニン411又はラミニン411E8フラグメントの存在下に網膜細胞への分化を制御する、請求項１記載の分化制御方法。

[請求項6] ラミニン411又はラミニン411E8フラグメントの存在下に神経堤細胞への分化を制御する、請求項１記載の分化制御方法。

[請求項7] 請求項１～６いずれかに記載の分化制御方法により誘導された多能性幹細胞の分化細胞を培養する、眼周囲細胞集団の製造方法。

[請求項8] 得られる細胞集団が角膜上皮細胞集団である、請求項７記載の製造方法。

[請求項9] 請求項８記載の製造方法により得られた角膜上皮細胞集団を使用することを特徴とする、移植用角膜上皮細胞シートの製造方法。

[請求項10] ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメントを含有してなる、多能性幹細胞の分化制御剤。

[請求項11] 多能性幹細胞の分化を制御するための、ラミニン111、ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメントの使用。

[請求項12] 多能性幹細胞の分化制御において使用するための、ラミニン111、

ラミニン211、ラミニン332、ラミニン411及びラミニン511からなる群より選ばれるラミニン又はそのE8フラグメント。