

明 細 書

発明の名称： プライム型多能性幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、プライム型多能性幹細胞の製造方法に関する。より詳細には、霊長類のナীব型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程を含む、プライム型多能性幹細胞の製造方法などに関する。

背景技術

[0002] 哺乳動物の発生段階においては、胚盤胞の内側に内部細胞塊が形成され、そこからエピブラストと原始内胚葉が出現する。エピブラストは、神経外胚葉や生殖細胞、原始腸管形成が行われて胚性中内胚葉に分化する一方、原始内胚葉は胚体外組織、特に卵黄嚢に分化する。この着床前胚のエピブラストはDNAメチル化レベルが最も低い細胞であり、発生が進むにつれてDNAメチル化が進んでいき、分化能力は限定される。ヒトなどの霊長類動物の従来型であるES細胞やiPS細胞は、発生が進んだプライム型に分類され、胎盤や原始内胚葉への分化は困難であった。またDNAメチル化レベルが高いことが知られている。

[0003] 以前、本発明者の一人である高島は、プライム型のヒト多能性幹細胞にNANOGとKLF2の2つの遺伝子を発現させることで、胚盤胞のエピブラストと同じ状態までヒト多能性幹細胞をリセットした、ナীব型多能性幹細胞(リセット細胞)を得ることに成功した(非特許文献1)。また、ナীব型多能性幹細胞を誘導する別の方法として、5種類のキナーゼ阻害剤、LIFおよびアクチビンA (5i/LIF/A) の存在下でプライム型多能性幹細胞を培養する方法(非特許文献2)や、一過的にヒストンデアセチラーゼ阻害剤存在下で培養を行う方法も報告されている(非特許文献3)。このようにして作製されたナীব型多能性幹細胞は、胎盤細胞の出発点にあたる栄養外胚葉に分化誘導が可能であるが(特許文献1)、形質が不安定であり維持培養が難しくコストもかかり、またプライム型多能性幹細胞で用いられる分化誘導方法を直接適用

することができないとの問題があった。そのため、通常の研究や再生医療用途ではもっぱらプライム型多能性幹細胞が使用されているのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2021/106765号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Takashima Y. et al., Cell, 158(6):1254-1269 (2014)

非特許文献2：Theunissen T.W. et al., Cell Stem Cell, 15(4):471-487 (2014)

非特許文献3：Guo G. et al., Development, 144(15):2748-2763 (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上述の通り、現在使用されている多能性幹細胞は、プライム型と呼ばれ、着床後胚の多能性幹細胞であり、着床前胚まではリプログラミングされていない細胞である。このためエピゲノムが完全にリセットされず、エピゲノムのメモリーが残っている場合があり、これらが現存の多能性幹細胞が株間において分化指向性をもつ原因であると考えられた。そこで、本発明は、従来の多能性幹細胞の分化能力を改善させる方法（換言すれば、分化能力が向上した多能性幹細胞を製造する方法）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

[0007] 本発明者らは、ナイーブ型多能性幹細胞の研究を進める中で、プライム型多能性幹細胞を一過的にナイーブ型多能性幹細胞に誘導後、再度プライム型多能性幹細胞に誘導することで、ナイーブ化誘導前のプライム型多能性幹細胞よりも分化抵抗性が格段に改善することを見出した。さらに、体細胞からプライム型細胞と同等の細胞状態を経由せずに直接ナイーブ型多能性幹細胞を誘導し、該細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導した場合に、体細胞から直接プライム型多能性幹細胞へと誘導した場合と比較して、分化能力が優

れていることを見出した。これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下の通りのものである。

[1]

プライム型多能性幹細胞を製造する方法であって、

(1) 霊長類動物のナীব型多能性幹細胞を準備する工程、および

(2) 前記工程(1)で準備したナীব型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程

を含む、方法。

[2]

工程(2)で得られたプライム型多能性幹細胞を回収する工程を含む、[1]に記載の方法。

[3]

前記工程(1)が、霊長類動物のプライム型多能性幹細胞を培養してナীব型多能性幹細胞を製造する工程である、[1]または[2]に記載の方法。

[4]

前記培養が14日間以上行われる、[3]に記載の方法。

[5]

細胞集団からCD320陽性細胞を選別する工程を含む、[3]または[4]に記載の方法。

[6-1]

前記工程(1)が、体細胞からプライム型多能性幹細胞を経ることなくナীব型多能性幹細胞を製造する工程である、[1]または[2]に記載の方法。

[6-2]

前記工程(1)で準備されたナীব型多能性幹細胞が、体細胞からプライム型多能性幹細胞を経ることなく製造されたものである、[1]または[

2] に記載の方法。

[6 - 3]

前記工程 (1) で準備されたナীব型多能性幹細胞が、体細胞に let-7-5p miRNA family に属する miRNA を導入することで製造されたものである、 [1] または [2] に記載の方法。

[6 - 4]

let-7-5p miRNA family に属する miRNA が miR-98-5p である、 [6 - 3] に記載の方法。

[7]

体細胞に初期化因子および let-7-5p miRNA family に属する miRNA を導入する工程を含む、 [6 - 1] に記載の方法。

[8]

let-7-5p miRNA family に属する miRNA が、 miR-98-5p、 let-7a-5p、 let-7b-5p、 let-7c-5p、 let-7e-5p、 let-7f-5p、 let-7g-5p および let-7i-5p からなる群から選択される少なくとも 1 種の miRNA である、 [7] に記載の方法。

[9 - 1]

細胞に骨形成タンパク質を導入する工程を含む、 [6 - 1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載の方法。

[9 - 2]

骨形成タンパク質が BMP4 である、 [9 - 1] に記載の方法。

[1 0]

細胞内の骨形成タンパク質を活性化する工程を含む、 [6 - 1] ~ [9 - 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 1 - 1]

初期化因子を有するウイルスベクターを体細胞に導入する工程を含む、 [6 - 1] ~ [1 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 1 - 2]

ウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、 [1 1 - 1] に記

載の方法。

[1 2]

前記工程（２）が、工程（１）で準備されたナイーブ型多能性幹細胞を、b F G Fを含む培地中で４日間以上培養する工程を含む、[1] ～ [1 1 － 2] のいずれか１つに記載の方法。

[1 3 － 1]

前記工程（２）が、フィーダーフリー条件下での培養である、[1] ～ [1 2] のいずれか１つに記載の方法。

[1 3 － 2]

前記工程（１）で準備した多能性幹細胞が、フィーダーフリー条件下で樹立された多能性幹細胞である、[1] ～ [1 3 － 1] のいずれか１つに記載の方法。

[1 3 － 3]

前記工程（２）が、ゼノフリー条件下での培養である、[1] ～ [1 3 － 2] のいずれか１つに記載の方法。

[1 3 － 4]

前記工程（１）で準備した多能性幹細胞が、ゼノフリー条件下で樹立された多能性幹細胞である、[1] ～ [1 3 － 3] のいずれか１つに記載の方法。

[1 4]

全培養期間がフィーダーフリーかつゼノフリー条件下である、[1] ～ [1 3 － 4] のいずれか１つに記載の方法。

[1 5 － 1]

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[1] ～ [1 4] のいずれか１つに記載の方法。

[1 5 － 2]

多能性幹細胞がヒト由来の細胞である、[1] ～ [1 5 － 1] のいずれか１つに記載の方法。

[1 6]

[1] ~ [1 5 - 2] のいずれか 1 つに記載の方法により得られたプライム型多能性幹細胞。

[1 7]

[1 6] に記載のプライム型多能性幹細胞を分化誘導させる工程を含む、細胞またはオルガノイドの製造方法。

[1 8]

前記細胞が、神経堤細胞、神経前駆細胞、神経細胞、造血前駆細胞、血小板、T細胞、エピブラスト様細胞、始原生殖細胞および心筋細胞からなる群から選択される、[1 7] に記載の方法。

[1 9 - 1]

前記オルガノイドが脳皮質オルガノイドである、[1 7] に記載の方法。

[1 9 - 2]

分化誘導させる工程が、フィーダーフリー条件下で行われる、[1 7] ~ [1 9 - 1] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 9 - 3]

分化誘導させる工程が、ゼノフリー条件下で行われる、[1 7] ~ [1 9 - 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[2 0]

多能性幹細胞の分化能力を向上させる方法であって、

(1) 霊長類動物のプライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞を誘導する工程、および

(2) 前記工程 (1) で誘導したナীব型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程を含む、方法。

[2 1]

工程 (2) で培養された多能性幹細胞を回収する工程を含む、[2 0] に

記載の方法。

[22]

前記工程(1)が14日間以上行われる、[20]または[21]に記載の方法。

[23]

前記工程(1)が、細胞集団からCD320陽性細胞を選別する工程を含む、[20]～[22]のいずれか1つに記載の方法。

[24]

前記工程(2)が、工程(1)で誘導されたナイーブ型多能性幹細胞を、bFGFを含む培地中で4日間以上培養する工程を含む、[20]～[23]のいずれか1つに記載の方法。

[25-1]

前記工程(1)および／または工程(2)が、フィーダーフリー条件下での培養である、[20]～[23]のいずれか1つに記載の方法。

[25-2]

前記工程(1)および／または工程(2)が、ゼノフリー条件下での培養である、[20]～[25-1]のいずれか1つに記載の方法。

[26-1]

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[20]～[25-2]のいずれか1つに記載の方法。

[26-2]

多能性幹細胞がヒト由来の細胞である、[20]～[26-1]のいずれか1つに記載の方法。

[27]

[17]～[19-3]のいずれか1つに記載の方法により製造された細胞またはオルガノイド。

[28]

[16]または[27]に記載の細胞またはオルガノイドを含む、医薬。

[2 9]

免疫療法または細胞移植療法のための、[2 8] に記載の医薬。

発明の効果

[0009] 本発明により、分化能力に優れた多能性幹細胞を製造することができる。
また、分化能力の低い多能性幹細胞であっても、分化能力を向上させることが可能となるため、現存の多能性幹細胞、特にiPS細胞の分化能力について、株間の差が小さくなり、様々な細胞への分化誘導が容易になるため、免疫療法、再生医療および創薬スクリーニングなどに有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型幹細胞への誘導過程における細胞形態変化を示す顕微鏡写真。

[図2]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞への誘導過程における表面抗原の経時変化をフローサイトメトリーで解析した結果を示す図。9日目(D9)の細胞の大部分は、プライム型マーカーが消失し、ナイーブマーカーを発現することが示された。

[図3]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞への誘導過程における遺伝子発現の経時変化をシングルセル解析しPCA解析した結果を示す図。

[図4]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞への誘導過程における経時変化をシングルセル解析し各クラスターの推移と割合をグラフ化した結果を示す図。

[図5]ナイーブ型多能性幹細胞への誘導日数ごとの原始内胚葉分化効率をフローサイトメトリーで解析した結果を示す図。scRNA-seqにおいて、リセット細胞の出現が示唆される時期に一致し、細胞が原始内胚葉へと分化できるようになることが示された。

[図6]ナイーブ型多能性幹細胞への誘導過程におけるナイーブマーカーCD320の発現をシングルセル解析とフローサイトメトリーで解析した結果を示す図。

[図7]ナイーブ型多能性幹細胞中のCD320-High positive細胞の顕微鏡下での

細胞形態、ナীবマーカー遺伝子のqPCR発現解析結果、原始内胚葉分化能のフローサイトメトリー結果を示す図。より具体的には、ナীব型多能性幹細胞へ誘導後19日目（Day19）の細胞集団からCD320強陽性細胞（CD320-High）とCD320弱陽性細胞（CD320-Low）を分取し、多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現と原始内胚葉への分化能を解析した結果である。A: Day19の細胞のCD320発現量をフローサイトメトリー法で解析したドットプロットを示す。四角で囲った2つの領域は、右側がCD320-High、左側がCD320-Lowの細胞集団を示す。B: Aで分取したCD320-High、CD320-Low細胞をそれぞれ培養して、1継代後（左パネル）、3継代後（右パネル）の位相差顕微鏡写真である。C: CD320-High、CD320-Low細胞について、各マーカー遺伝子の発現量をqPCR法で解析した結果を示すグラフである。遺伝子発現のグラフ（C）において、遺伝子ごとに、左からプライム型多能性幹細胞、ナীব型多能性幹細胞、CD320強陽性細胞（Day19）、CD320弱陽性細胞（Day19）、CD320強陽性細胞（選別後3継代）、CD320弱陽性細胞（選別後3継代）の発現量を示す。それぞれ、N=2。エラーバー：標準誤差。D: 非選別（Bulk）、CD320-High細胞、CD320-Low細胞をそれぞれ原始内胚葉に分化誘導し、原始内胚葉マーカーの発現でフローサイトメトリー解析した結果を表す。ドットプロット中、四角で囲んだ領域が原始内胚葉に分化した細胞を表す。

[図8] プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞への誘導過程における経時変化。

[図9] プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞への誘導過程におけるEOS-GFP陽性細胞の発現推移をフローサイトメトリーで解析した結果。

[図10] ナীব型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導し顕微鏡で観察した結果を示す図。スケールバー：100 μ m。

[図11] プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞へ誘導し再度プライム型多能性幹細胞へ誘導した過程における表面抗原の経時変化をフローサイトメトリーで解析した結果を示す図。

[図12] プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞へ誘導し再度プ

ライムド型多能性幹細胞へ誘導した過程で使用した培地・試薬と表面マーカーの模式図。

[図13]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞を神経細胞へ分化誘導しフローサイトメトリーにて解析した結果および心筋細胞へ分化誘導し拍動する割合を解析した結果を示す図。

[図14]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞を始生殖細胞へ分化誘導しフローサイトメトリーにて解析した結果を示す図。

[図15]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞を神経堤細胞へ分化誘導しフローサイトメトリーにて解析した結果を示す図。

[図16]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞を巨核球株(imMKCL)に誘導し、成熟培養後の血小板産生数をフローサイトメトリーにて解析した結果を示す図。

[図17]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞をT前駆細胞(DP細胞：CD4陽性、CD8b陽性)に誘導し、誘導した割合をフローサイトメトリーにて解析した結果を示す。プロットのX軸ならびにY軸はT細胞表面のCD4, CD8b, CD5, CD28, CD1a分子の発現量を示す。上段のOriginal H25-4はプライム型多能性幹細胞由来のT前駆細胞で、下段のReprimed H25-4はナイーブ型多能性幹細胞への誘導を経て再度プライム型多能性幹細胞へと分化させた後、誘導されたT前駆細胞である。

[図18]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞をT前駆細胞(DP細胞)に誘導後、さらに成熟T細胞(CD8SP細胞：CD5陽性/CD28陽性 CD8陽性)に誘導した割合をフローサイトメトリーにて解析した結果を示す。ヒストグラムのX軸ならびに

プロットのX軸およびY軸は成熟T細胞表面のCD8b, CD5, CD28分子の発現量を示す。上段のOriginal H25-4はプライム型多能性幹細胞由来の成熟T細胞で、下段のReprimed H25-4はナイーブ型多能性幹細胞への誘導を経て再度プライム型多能性幹細胞へと分化させた後、誘導された成熟T細胞である。

[図19]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞をT細胞(DP細胞)さらに成熟T細胞(CD8SP細胞)に誘導した後、拡大培養を行いフローサイトメトリーにて解析した結果を示す。上段のOriginal H25-4はプライム型多能性幹細胞由来の成熟T細胞で、下段のReprimed H25-4はナイーブ型多能性幹細胞への誘導を経て再度プライム型多能性幹細胞へと分化させた後、誘導された成熟T細胞である。プロットは、成熟T細胞表面に発現しているCD8bとT細胞受容体(TCRab)ならびに、成熟T細胞で発現していないNKp44分子の発現量を示す。

[図20]プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞を誘導した。該細胞を大脳皮質オルガノイドへ分化誘導した過程で使用した培地・試薬と評価方法の模式図。

[図21]プライム型多能性幹細胞（上段）からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞（下段）を誘導した。該細胞を大脳皮質オルガノイドへ分化誘導した明視野での細胞形態とFOXG1/CTIP2/PAX6/DAPIで免疫染色を実施した顕微鏡写真の図。

[図22]プライム型多能性幹細胞（左）からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞（右）を誘導した。該細胞から分化誘導した、ロゼット含有オルガノイド（大脳皮質オルガノイド）の割合（% of rosette-containing organoids）のグラフ。

[図23]体細胞からナイーブ型多能性幹細胞への誘導過程における細胞形態変化を示す顕微鏡写真の図。

[図24]体細胞からナイーブ型多能性幹細胞へ誘導し再度プライム型多能性幹細胞を誘導した細胞形態変化を示す顕微鏡写真の図。

[図25]体細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導した（左）。体細胞からナ

イーブ型幹細胞への誘導し再度プライム型多能性幹細胞を誘導した（右）。該細胞についての顕微鏡写真と始原生殖細胞を分化誘導しフローサイトメトリーにより解析した結果を示す図。

[図26]体細胞からmRNA法にてプライム型iPS細胞（primed iPSC）誘導し、ケミカルリセット法にてナイーブ型多能性幹細胞を誘導した。体細胞としてヒト末梢血単核細胞（PBMC）を使用した。ナイーブ型多能性幹細胞への誘導開始（Day 0）から、典型的なナイーブ型多能性幹細胞コロニーが得られるまで（Day 13）の経時変化を示す位相差顕微鏡写真である（上）。誘導開始から19日間培養し、qPCR解析した結果、ナイーブ型多能性幹細胞に発現する遺伝子を発現する（下）。

[図27]体細胞からmRNA法を用いてナイーブ型多能性幹細胞を誘導した。体細胞として、新生児由来線維芽細胞株（Neonatal HDF）、成人由来線維芽細胞株（Adult HDF1(Promocell), 2(Thermo)）を使用し、マイクロRNAとして、miR-98-5p、let-7a-5p、let-7b-5pをそれぞれ使用した。得られたナイーブ型多能性幹細胞の位相差顕微鏡写真（左）と、多能性幹細胞のマーカー遺伝子（Oct3/4、KLF4、NANOG、KLF17）の発現量をqPCRで解析した結果（右）を示す。

[図28]体細胞からナイーブ型多能性幹細胞を誘導し、該ナイーブ型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞（直接誘導型ナイーブ型細胞由来のプライム型多能性幹細胞）を誘導した。体細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を使用し、マイクロRNA（miR-98-5p）またはBMP4を使用してナイーブ型細胞へと誘導し（左）、その後プライム型へと誘導して、直接誘導型ナイーブ型細胞由来のプライム型多能性幹細胞を得た（右）。各細胞の位相差顕微鏡写真を示す。

[図29]体細胞からセンダイウイルスベクター（SeV）を用いてプライム型またはナイーブ型多能性幹細胞を誘導し、当該ナイーブ型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞（直接誘導型ナイーブ型細胞由来のプライム型多能性幹細胞）を誘導した。体細胞として、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を使用した。各細胞の位相差顕微鏡写真を示す。

[図30]図29に例示されるナীব型多能性幹細胞(A)からフローサイトメトリーを用いてCD320強陽性細胞を選別し、CD320強陽性細胞(CD320+ cells)と非選別細胞(Bulk)からプライム型多能性幹細胞(直接誘導型ナীব型細胞由来プライム型多能性幹細胞)をそれぞれ誘導した(B)。非選別細胞における、CD320+細胞とCD320-細胞との割合をCに示す。センダイウイルスゲノムの残存量をqPCRで測定した結果をDに示す。CD320強陽性細胞および非選別細胞(Bulk)のいずれにおいても、センダイウイルスは残存していた。primed iPSCは、SeVでなく、mRNA法で誘導したプライム型iPSC(図26のプライム型iPSC)を示す。Day1は、SeV法でナীব型へ誘導した、Day1(=SeVに感染させた翌日)におけるiPSCを示す。*primed iPSC (passage 10th)は、SeV法で誘導したプライム型iPSC(図29の上段の細胞)で、10継代培養後のものを示す。

[図31]図30に例示されるCD320強陽性(CD320+ cells)または非選別(Bulk)のナীব型細胞に由来するプライム型多能性幹細胞を、始原生殖細胞へと分化誘導し、フローサイトメトリーを用いて分化効率を解析した。左図は、2種類の始原生殖細胞マーカー(CD326 (EpCAM)とCD49f (ITGA6))の表面発現を解析したドットプロットで、多角形で囲まれた領域が両陽性細胞(PGCLC)を表す。右図は、PGCLCの割合(PGCLCへの分化効率)を表すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 1. プライム型多能性幹細胞の製法および該製法で得られたプライム型多能性幹細胞

本発明は、分化能力に優れたプライム型多能性幹細胞を製造する方法を提供する。具体的には、本発明は、

- (1) 霊長類動物のナীব型多能性幹細胞を準備する工程、および
 - (2) 前記工程(1)で準備したナীব型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程
- を含む、プライム型多能性幹細胞を製造する方法(以下、「本発明の製法」

と称することがある。)を提供する。

[0012] 以下では、特に断らない限り、多能性幹細胞は霊長類動物の多能性幹細胞を意味する。かかる霊長類動物としては、特に制限されないが、メガネザル、オナガザル、カニクイザル、アカゲザル、ニホンザル、テナガザル、クモザル、オマキザル、オラウータン、ゴリラ、チンパンジー、ヒトなどの直鼻亜目動物、キツネザル、アイアイ、ロリスなどの曲鼻亜目動物などが挙げられるが、好ましくはヒトである。

[0013] 本明細書において、特に断りのない限り、「細胞」には、「細胞集団」が含まれるものとする。細胞集団は、1種類の細胞から構成されていてもよく、2種類以上の細胞から構成されていてもよい。また、細胞集団は、スフェロイドやオルガノイドなどの細胞凝集体の形態であってもよい。

[0014] 本明細書において、「多能性幹細胞」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（即ち、分化多能性）を有する幹細胞を意味する。本発明に用いる多能性幹細胞としては、例えば、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS細胞、iPSC）、胚性幹細胞（embryonic stem cell: 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（nuclear transfer embryonic stem cell: ntES細胞）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）などが挙げられるが、好ましくはES細胞およびiPS細胞であり、iPS細胞がより好ましい（特にヒトiPS細胞が好ましい）である。上記多能性幹細胞がES細胞またはヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、胚を破壊することなく作製された細胞であってもよいが、倫理的な観点からは、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。

[0015] ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚（例えば胚盤胞）の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。ES細胞は、マウスで1981年に発見され（M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156）、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞

胞株が樹立された (J.A. Thomson et al. (1998) , Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995) , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996) , Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998) , Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165) 。

[0016] nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している (Wakayama T. et al. (2001) , Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005) , Biol. Reprod., 72:932-936; Byrne J. et al. (2007) , Nature, 450:497-502) 。即ち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES (nuclear transfer ES) 細胞である。

[0017] iPS細胞は、哺乳動物体細胞または未分化幹細胞に、特定の因子 (初期化因子) を導入してリプログラミングすることにより得られる細胞である。EG細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞である。

[0018] 本明細書において、「ナীব型(naive)多能性幹細胞」とは、リセット細胞とも呼ばれ、着床前胚に類似した性質を持つ多能性幹細胞を意味する。具体的には、ナীব型多能性幹細胞は、分化多能性および自己複製能に加えて、以下の特徴を有する。

(A) ドーム型のコロニー形態を示し、コロニーの大きさはプライム型多能性幹細胞より小さい。

[0019] ナীব型多能性幹細胞は、典型的には、以下の特徴(B)および(C)も有する。

(B) CD320、SUSD2、CD75、KLF17およびTFCP2L1からなる群から選択される1つ以上のマーカーを発現する。好ましくは、少なくともCD320を発現し、より好ましくはCD320およびSUSD2を発現する。

(C) 全ゲノムに亘る広範なDNAが脱メチル化されている。

[0020] また、本発明で用いるナীব型多能性幹細胞は、以下の特徴(D)および(E

)の少なくともいずれかをさらに有していてもよい。

(D)性染色体のXXのペアを有する細胞において、両X染色体とも活性化 (XaXa) している。

(E)miR-373-3p、miR-520c-3pおよびmiR-520hからなる群から選択される1つ以上（好ましくは、3つ全て）のmiRNAを発現する。

[0021] 本明細書において、「プライム型 (primed) 多能性幹細胞」とは、着床後胚のエピブラストに類似した性質を持つ多能性幹細胞を意味し、体細胞に初期化因子を導入して得られる一般的な人工多能性幹細胞やヒトES細胞がこれに該当し、下述のようなナイーブ化処理をされていない細胞である。具体的には、プライム型多能性幹細胞は、分化多能性および自己複製能に加えて、以下の特徴を有する。

(A') 平坦なコロニー形態を示し、コロニーの大きさはナイーブ型多能性幹細胞より大きい。

[0022] プライム型多能性幹細胞は、典型的には、以下の特徴(B') および(C') も有する。

(B') CD320、SUSD2、CD75、KLF17およびTFCP2L1をいずれも発現せず、CD24およびCD90を発現する。

(C') ナイーブ型多能性幹細胞よりもゲノムにおけるメチル化の程度が高い。

[0023] また、本発明で用いるプライム型多能性幹細胞は、以下の特徴(D') および(E') の少なくともいずれかをさらに有していてもよい。

(D') 性染色体のXXのペアを有する細胞において、一方のX染色体が不活化 (XaXi) しているか、あるいはエロージョン (erosion) をおこなっている (XeXi)。

(E') miR-520hを発現しない。

[0024] 本明細書において、タンパク質またはmiRNAが「発現しない」、または「陰性」とは、下述の実施例と同様の方法により発現が認められないことを意味する。

[0025] 本発明の製法の工程（１）は、プライム型多能性幹細胞から、公知の方法によりナイーブ型多能性幹細胞を製造する（「ナイーブ化処理」ともいう）ことにより行うことができる。従って、一態様において、本発明の製法の工程（１）は、プライム型多能性幹細胞を培養してナイーブ型多能性幹細胞を製造する工程である。かかる方法としては、具体的には、例えば、プライム型多能性幹細胞にNANOGとKLF2を一過的に過剰発現させる方法（非特許文献１）、プライム型多能性幹細胞を、５種類のキナーゼ（MEK、GSK3、BRAF、SRCおよびROCK）阻害剤、LIFおよびアクチビンA（5i/L/A）存在下で培養する方法（非特許文献２）、プライム型多能性幹細胞をHDAC（ヒストンデアセチラーゼ）阻害剤存在下で培養する方法（非特許文献３）などが挙げられる。図１に記載の方法により製造するもできる。あるいは、本発明で用いるナイーブ型多能性幹細胞は、既に樹立されたナイーブ型多能性幹細胞を購入等することにより入手することもできる。以下では、多能性幹細胞の「製造」は、多能性幹細胞の「樹立」または「誘導」と読み替えることもできる。

[0026] ナイーブ型多能性幹細胞維持培地としては、例えば、基礎培地に対し、STAT3活性化剤（典型的には、LIF（Leukemia inhibitory factor））、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、cAMP産生促進剤、TGF- β 阻害剤、およびPKC阻害剤、Tankyrase/Wnt/ β -catenin阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含めた培地が挙げられる。ナイーブ型を誘導する際に用いる培地には、多能性幹細胞の株により、STAT3活性化剤（典型的には、LIF）を含めても含めなくともよい。一方で、ナイーブ型となった多能性幹細胞を培養する培地には、STAT3活性化剤（典型的には、LIF）を含めなくとも該細胞は維持され得る。典型的には、MEK阻害剤を含む培地が用いられるが、好ましくはMEK阻害剤およびLIFを含む培地が用いられる。また、基礎培地としては、N2B27培地（市販品名：Ndiff227 [Takara Bio, Cat. Y40002]）（DMEM/F12培地にN2サプリメントを添加したN2培地と、Neurobasal培地にB27サプリメントを添加したB27培地とを１：１に混合した培地）が用いられる。ナイーブ型多能性幹細胞維持培地はまた、bFGFを実質的に含まないことが好ましい。一態様において、ナイーブ型多能性幹

細胞維持培地には、XAV939が含まれず、典型的には、XAV939以外のTankyrase/Wnt/ β -catenin阻害剤も含まれない。さらに別の一態様において、ナイーブ型多能性幹細胞維持培地には、CHIR99021が含まれず、典型的には、CHIR99021以外のGSK3阻害剤も含まれない。

- [0027] STAT3活性化剤としては、特に限定されないが、例えば、インターロイキン6 (Interleukin-6; IL-6)、白血病阻止因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF)、オンコスタチンM、レプチン、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) が挙げられる。中でも、IL-6、LIFが好ましく、LIFがより好ましい。また、LIFは、ヒトLIFであることが好ましい。培地中のLIFの濃度は、1 ng/ml~100 ng/ml、または5 ng/ml~50 ng/mlであってよく、例えば約10 ng/mlである。
- [0028] MEK阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、PD0325901 (N-[2-(2,3-ジヒドロキシプロポキシ)-4-フルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]ベンズアミド; CAS登録番号: 391210-10-9)、UO126 (1,4-ジアミノ-2,3-ジシアノ-1,4-ビス[2-アミノフェニルチオ]ブタジエン; CAS登録番号: 109511-58-2)、PD98059 (2-(2-アミノ-3-メトキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン; CAS登録番号: 167869-21-8)、PD184352 (2-(2-クロロ-4-ヨードフェニルアミノ)-N-シクロプロピルメトキシ-3,4-ジフルオロベンズアミド; CAS登録番号: 212631-79-3)が挙げられる。なかでも、PD0325901が好ましい。MEK阻害剤としてPD0325901を用いる場合、その培地中の濃度は、50 nM~100 μ M、または100 nM~10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。
- [0029] GSK3阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル]アミノ]エチル]アミノ]-3-ピリジんカルボニトリル; CAS登録番号: 252917-06-9)、BI0 (6-ブロモインジルビン-3'-オキシム; CAS登録番号: 667463-62-9)、Kenpaullo

ne (9-ブロモ-7, 12-ジヒドロインドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン; CAS登録番号: 142273-20-9)、IM-16 (3-(4-フルオロフェニルエチルアミノ)-1-メチル-4-(2-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン; CAS登録番号: 1129669-05-1) が挙げられる。なかでも、CHIR99021が好ましい。GSK3阻害剤としてCHIR99021を用いる場合、その培地中の濃度は、50nM~100 μ M、または100nM~10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0030] cAMP産生促進剤としては、特に限定されないが、例えば、フォルスコリンが挙げられる。cAMP産生促進剤としてフォルスコリンを用いる場合、その培地中の濃度は、50nM~100 μ M、または100nM~10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0031] TGF- β 阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、A83-01 (3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド)、SB431542 (4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド) が挙げられる。なかでも、A83-01が好ましい。TGF- β 阻害剤としてA83-01を用いる場合、その培地中の濃度は、10nM~100 μ M、または100nM~10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0032] PKC阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、Go6983 (3-[1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-5-メトキシ-1H-インドール-3-イル]-4-(1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン; CAS登録番号: 133053-19-7)、GF109203X (3-(1-(3-ジメチルアミノ)プロピル)-1H-インドール-3-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン; CAS登録番号: 133052-90-1) が挙げられる。なかでも、Go6983が好ましい。PKC阻害剤としてGo6983を用いる場合、その培地中の濃度は、50nM~100 μ M、または100nM~10 μ Mであり得、例えば約1 μ M~3 μ Mである。

[0033] Tankyrase/Wnt/ β -catenin阻害剤としては、特に限定されないが、例えば

、XAV939 (2-(4-トリフルオロメチルフェニル)-7,8-ジヒドロ-5H-チオピラノ [4,3-d]ピリミジン-4(3H)-オン ; CAS登録番号 : 284028-89-3) 、IWT-2, IWP-3, IWP-4が挙げられる。Tankyrase/Wnt/ β -catenin阻害剤としてXAV939を用いる場合、その培地中の濃度は、0.5 μ M ~ 100 μ M であり得、例えば約2 μ Mである。

[0034] ナイーブ型多能性幹細胞維持培地には、HDAC阻害剤が含まれていてもよい。HDAC阻害剤としては、バルプロ酸 (別名 : 2-Propylvaleric acid) 、sodium butyrate、suberoylanilide hydroxamic acid, BRD4884 (N-(4-アミノ-4'-フルオロ[1,1'-ビフェニル]-3-イル) テトラヒドロ-2H-ピラン-4-カルボキサミド ; CAS登録番号 : 1404559-91-6) 、BRD668 8 (N-[2-アミノ-5-(4-ピリジニル)フェニル]-1-ピロリジンカルボキサミド ; CAS登録番号 : 1404562-17-9) が挙げられるが、これらには限定されない。HDAC阻害剤の培地中での濃度は、例えば、0.1mMから10mM程度であってよく、0.5mMから5mM程度であることが好ましい。

[0035] 培地には、ROCK阻害剤が含まれていてもよい。ROCK阻害剤としては、Rhoキナーゼ (ROCK) の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632 (例、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000) ; Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284 (2000)参照) 、Fasudil /HA1077 (例、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照) 、H-1152 (例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照) 、Wf-536 (例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照) およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸 (例、siRNA) 、ドミナントネガティブ変異体、およびそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の公知の低分子化合物も使用できる (例えば、米国特許出願公開第2005/0209261号、同第2005/0192304号、同第2004/0014755号、同第2004/0002508号、同第2004/0002507号、同第2003/0125344号、同第2003/0087919号、国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第200

4/039796号参照)。ROCK阻害剤の濃度は、使用するROCK阻害剤に応じて当業者により適宜選択可能であるが、例えば、ROCK阻害剤としてY-27632を用いる場合、 $0.1\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ 、好ましくは $1\mu\text{M}$ から $50\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $5\mu\text{M}$ から $20\mu\text{M}$ である。

[0036] ナイーブ型多能性幹細胞維持培地として、具体的には、以下のものが挙げられる。

- ・ t2iLGo (非特許文献 1)

N2B27 + PD0325901($1\mu\text{M}$) + CHIR99021($1\mu\text{M}$) + LIF(10 ng/ml) + Go6983($2\text{--}3\mu\text{M}$)

- ・ 5i/L/A(非特許文献 2)

N2B27 + PD0325901($1\mu\text{M}$) + CHIR99021($1\mu\text{M}$) + SB590885 ($0.5\mu\text{M}$) + WH-4-023 ($1\mu\text{M}$) + Y-27632($10\mu\text{M}$) + LIF(10 ng/ml) + Activin A(20 ng/ml)

- ・ tt2iLc + iWNT (非特許文献 3)

N2B27 + PD0325901($1\mu\text{M}$) + LIF(10 ng/ml) + Go6983($2\mu\text{M}$) + XAV939($2\mu\text{M}$)

- ・ Chemical Resetting Medium 1(cRM-1)

N2B27 + PD0325901($1\mu\text{M}$) + LIF(10 ng/ml) + バルプロ酸ナトリウム塩(1mM)

- ・ Chemical Resetting Medium 2(cRM-2)

N2B27 + PD0325901($1\mu\text{M}$) + LIF(10 ng/ml) + Go6983($2\mu\text{M}$) + XAV939($2\mu\text{M}$)

[0037] ナイーブ型多能性幹細胞維持培地とプライム型多能性幹細胞維持培地とは、典型的には、プライム型多能性幹細胞維持培地はLIFを実質的に含有しない点、及びナイーブ型多能性幹細胞培養培地はbFGFを実質的に含有しない点で、区別することができる。

[0038] ナイーブ型多能性幹細胞維持培地は、培養の途中で適宜変更することもでき、例えば、培養 1 日目～4 日目はcRM-1を用い、その後の培養はcRM-2を用いることもできる。

また、NaiveCult Induction Kit[STEMCELL Technologies, Cat. ST-05580]、NaiveCult Expansion Medium [STEMCELL Technologies, Cat. ST-05590]などの市販のナীব型多能性幹細胞維持培地を用いてもよい。

[0039] プライム型多能性幹細胞から、ナীব型多能性幹細胞を誘導する期間は特に制限されないが、通常6日間以上（例：7日間、8日間、9日間、10日間またはそれ以上）である。下述の実施例で示される通り、プライム型多能性幹細胞の培養開始から14日目にCD320を発現する細胞の割合が高くなったため、上記誘導する期間は、14日間以上が好ましく、19日間以上（例えば、20日間またはそれ以上）がより好ましい。上限についても特に制限はないが、典型的には70日間以下(20継代以下)が好ましい。

[0040] また、プライム型多能性幹細胞から、ナীব型多能性幹細胞を誘導する工程において、細胞集団から、ナীব型多能性幹細胞に発現するマーカー陽性細胞を選別（単離または精製とも換言できる）する工程を含んでもよい。かかるマーカーとしては、例えば、CD320、SUSD2、CD75などが挙げられるが、特にCD320が好ましい。後述の実施例で示される通り、CD320はより未分化な状態のナীব型多能性幹細胞のマーカーとなり得るため、CD320陽性細胞（特に、CD320強陽性細胞）を選別することで、より未分化な状態のナীব型多能性幹細胞を濃縮することができる。また、ナীব型多能性幹細胞に発現するマーカー以外にも、X染色体の活性化やその他の指標を基にナীব型多能性幹細胞を選別してもよい。

[0041] 本明細書において、「CD320陽性」とは、特に断らない限り、「CD320 mRNAにコードされたタンパク質の産生」を意味する。したがって、CD320タンパク質が、後述の実施例に記載の方法（フローサイトメトリー）で検出された場合には、CD320陽性といえる。CD320以外のナীব型多能性幹細胞に発現するマーカーについても、同様である。また、本明細書において、「陽性」には、強く発現する場合（「強陽性」とも称する。）および弱く発現する場合（「弱陽性」とも称する。）が含まれる。強陽性および弱陽性は、フローサイトメトリー法により得られるチャートに基づき、判断することができる。

チャートに現れる位置は、機器の電圧設定、感度設定、使用抗体クローン、染色条件、使用色素等により変動することがあるが、当業者であれば、得られたチャートにおいて一群と認められる細胞集団を切り分けないように適宜線引きすることができる。

- [0042] CD320陽性細胞の選別方法は、公知の方法を適宜用いることができ、例えば、CD320に対する抗体により標識し、フローサイトメトリーやマスサイトメトリーを用いた方法、磁気細胞分離法、所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて選別する方法などが挙げられる。
- [0043] ナイーブ型多能性幹細胞の元となるプライム型多能性幹細胞は、公知の方法により製造することができる。例えば、ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。あるいは、ES細胞は、胚盤胞期以前の卵割期の胚の単一割球のみを用いて樹立することもできるし（Chung Y. et al. (2008), Cell Stem Cell 2: 113-117）、発生停止した胚を用いて樹立することもできる（Zhang X. et al. (2006), Stem Cells 24: 2669-2676.）。
- [0044] nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（Cibelli J.B. et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646）とES細胞作製技術（上記）との組み合わせが利用される（若山清香ら（2008），実験医学，26巻，5号（増刊），47～52頁）。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。
- [0045] 本発明で用いるES細胞株としては、ヒトES細胞株であれば、例えば、ウィスコンシン大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医療研究センターおよびCellartis社などが樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。具体的には、例えば、ヒトES細胞株としては、ESI Bio社が分譲するCHB-1～CHB-12株、RUE S1株、RUES2株、HUES1～HUES28株等、WiCell Researchが分譲するH1株、H9株等、理研が分譲するKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株などが挙げられる。

[0046] 現在、iPS細胞にはさまざまなものがあり、山中らにより、ヒト線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたヒト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-iPSC (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iPSC (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iPSC (Okita K et al. Nat. Methods 2011 May ;8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.) 等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、公開されているすべての論文 (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 Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)、あるいは特許 (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。Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、NANOG、LIN28などの体細胞のリプログラミングに寄与する因子が初期化因子である。

[0047] 人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種iPSC株が利用可能である。例えば、ヒトiPSC株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等、京都大学のAdiPS細胞

、253G1株、253G4株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1383D2株、1383D6株、201B7株、409B2株、454E2株、585A1株、585B2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A3株、FfI-01s04株等が挙げられる。

[0048] 本発明の製法で用いる人工多能性幹細胞は、遺伝性疾患の患者由来の細胞であってもよい。遺伝性疾患の患者由来の多能性幹細胞から分化誘導させた細胞は、該疾患の病態を反映する疾患モデルとなり得るため、該疾患の治療または予防薬のスクリーニングなどに適している。あるいは、遺伝性疾患の患者由来の多能性幹細胞に対して、CRISPR-Casシステムなどを用いたゲノム編集により遺伝子を修復した上で目的の細胞またはオルガノイドへと分化させることで、該細胞を該疾患の治療薬として用いることも可能となる。

[0049] EG細胞は、LIF、bFGF、幹細胞因子 (stem cell factor) などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立し得る (Matsui Y. et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。その他多能性幹細胞も、公知の方法により樹立することができる。

[0050] また、本発明の製法の工程(1)で準備されたナীব型多能性幹細胞は、体細胞からプライム型多能性幹細胞を経ることなく製造された細胞であってもよい。本明細書において、「プライム型多能性幹細胞を経ることなく製造された」とは、体細胞に初期化因子を導入した後、該細胞を上記で定義するプライム型多能性幹細胞維持培地中で培養した後に誘導される方法ではないことを意味し、ナীব型多能性幹細胞の製造途中において、一過的にプライム型多能性幹細胞あるいはプライム型多能性幹細胞に類似する細胞が生じる場合を排除するものではない。ここで、「プライム型多能性幹細胞に類似する細胞」とは、多能性までは有さないものの、Nanog、Oct4、TRA-1-60およびSSEA-3からなる群から選択される多能性幹細胞マーカーの少なくとも1つを発現する細胞を意味する。また、「プライム型多能性幹細胞維持培地中で培養した」とは、初期化因子導入時または導入後の一定期間(典型的には、初期化因子の最終導入後12時間~2日間)以後も、細胞を、bFGFを含む培地中で培養する工程を含むことを意味する。このようにして製造されたナীব

ブ型多能性幹細胞から誘導して得られるプライム型多能性幹細胞を、「直接誘導型ナীব型細胞由来のプライム型多能性幹細胞」と称することがある。

[0051] リプライム型多能性幹細胞と直接誘導型ナীব型細胞由来のプライム型多能性幹細胞は、特に断らない限り、これらのプライム型多能性幹細胞を包含する用語として、「本発明の多能性幹細胞」と称することがある。よって、別の態様において、本発明の製法により得られたプライム型多能性幹細胞（即ち、本発明の多能性幹細胞）が提供される。

[0052] リプライム型多能性幹細胞と直接誘導型ナীব型細胞由来のプライム型多能性幹細胞とは、ゲノムのメチル化状態および分化能力が同等であると推測される。従って、本発明の多能性幹細胞は、上述のプライム型多能性幹細胞の特徴（ただし、特徴（C）および（C'）を除く）に加え、高分化能力を有し、またゲノムのメチル化の程度が低い細胞であり得る。よって、本発明の多能性幹細胞は、「高分化能力保有プライム型多能性幹細胞」といえる。また、高分化能力保有プライム型多能性幹細胞は、典型的には、「ゲノムにおけるメチル化を一度リセットした」細胞である。

[0053] 本明細書において「高分化能」（換言すれば、「低分化抵抗性」）とは、リプライム型多能性幹細胞の場合には、ナীব化処理を行う前のプライム型多能性幹細胞と比較して「分化能力が高いこと」（換言すれば、「分化抵抗性が低いこと」）を意味する。また、直接誘導型ナীব型細胞由来のプライム型多能性幹細胞の場合には、同じ株の体細胞から、ナীব型多能性幹細胞を経由せずに誘導したプライム型多能性幹細胞と比較して、「分化能力が高いこと」を意味する。また、「分化能力が高い」とは、少なくとも1種（通常は複数種類）の細胞への分化効率が高いことを意味する。

[0054] 本明細書において、「体細胞」とは、動物を構成する細胞のうち、生殖細胞以外の細胞を意味する。体細胞としては、特に限定されないが、胎児（仔）の体細胞、新生児（仔）の体細胞、及び成熟した健全な若しくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株

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

[0055] 直接誘導型プライム型多能性幹細胞は、例えば、体細胞に初期化因子およびlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入し、該細胞をナীব型多能性幹細胞維持培地中で培養することなどにより製造することができる。よって、本発明の一態様において、本発明の製法の工程（１）は、初期化因子およびlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入した体細胞を、ナীব型多能性幹細胞維持培地中で培養する工程であり、かかる工程は、典型的には、細胞をプライム型多能性幹細胞維持培地で培養する工程は含まれない。またlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを加えること、および／または該miRNAの標的タンパク質の発現を抑制することによって、直接誘導型プライム型多能性幹細胞の製造を加速させることができる。

[0056] 初期化因子およびlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入した体細胞は、初期化因子とlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAとを同時に体細胞に導入することにより準備してもよく、あらかじめ初期化因子を入れた体細胞に、期間を開けてlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入することにより準備してもよく、あるいは、あらかじめlet-7-5p miRNA familyを導入した体細胞に、期間を開けて初期化因子を導入することにより準備してもよい。また、初期化因子および／またはlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAの体細胞への導入は、１回でもよく、複数回（例：２回、３回、４回、５回またはそれ以上）であってもよい。

[0057] 一態様において、本発明の製法の工程（１）で準備されたナীব型多能性幹細胞は、体細胞にlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入すること、および／または該miRNAの標的タンパク質の発現を抑制することで製造され

ても良い。また、本発明の製法の工程（１）は、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入した、および／または該miRNAの標的タンパク質の発現が抑制された細胞を培養してナイーブ型多能性幹細胞を製造する工程でもよい。

[0058] よって、本発明の別の態様において、初期化因子およびlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入した体細胞を、ナイーブ型多能性幹細胞維持培地中で培養する工程を含む、ナイーブ型多能性幹細胞の製造方法（以下、「本発明のナイーブ型多能性幹細胞の直接誘導法」と称することがある。）も提供される。

[0059] let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAとしては、例えば、miR-98-5p、let-7a-5p、let-7b-5p、let-7c-5p、let-7e-5p、let-7f-5p、let-7g-5p、let-7i-5pが挙げられる。これらのmiRNAの配列を下記表１に示す。これらの類似配列、例えば、(1)表１に記載の配列と、90%以上の配列同一性、好ましくは95%以上（例：96%、97%、98%、99%またはそれ以上）の配列同一性を有する配列からなるmiRNA、(2)表１に記載の配列において、１または複数個（例：2、3個）の塩基が欠失、置換、挿入および／または付加された配列からなるmiRNA、(3)表１の配列のヒト以外の哺乳動物（好ましくは、霊長類動物）におけるオルソログなども、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAと機能の同一性を維持し得るため、用いることができる。これらのうち、１種類を用いることもでき、２種類以上を組み合わせ用いることもできる。本明細書において、特に断らない限り、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAには、表１に記載のmiRNAの配列の類似配列を有するmiRNA、およびこれらのミミックも含まれるものとする。

[0060]

[表1]

配列名	配列	配列番号
miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	1
let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	2
let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	3
let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	4
let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	5
let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	6
let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	7
let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	8

[0061] 体細胞に導入する初期化因子は、タンパク質の形態であってもよく、該タンパク質をコードする核酸（RNAまたはDNA）や該核酸を含む発現ベクター（例えば、センダイウイルスなどのウイルスベクター等）の形態であってもよい。初期化因子をRNAの形態で導入する場合には、細胞に導入された免疫原性のRNAにより細胞防御機構の活性化が生じ得るため、該防御機構を回避するためのRNA（例えば、ワクシニアウイルス由来のE3 mRNA、K3L mRNA、B18 mRNA、これらのmRNAの組合せ等）を体細胞に導入することが好ましい。また、多能性幹細胞の樹立効率向上のため、各種miRNAまたはそのミミック（例えば、miR-302a-3pまたはそのミミック、miR-302b-3pまたはそのミミック、miR-302c-3pまたはそのミミック、miR-302d-3pまたはそのミミック、miR-367-3pまたはそのミミック、これらのmiRNAまたはそのミミックの組合せ等）を体細胞に導入してもよい。

[0062] let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAなどのmiRNAを体細胞に導入する場合には、天然型のmiRNAの形態でもよく、核酸に化学修飾が付されたmiRNAでもよく、miRNAミミックでもよく、あるいはmiRNAをコードするDNAや該DNAを含む発現ベクターの形態であってもよいが、好ましくはmiRNAミミックである。miRNAミミックは、二本鎖RNAの形態であり、典型的には、天然型RNAからなるガイド鎖と、化学修飾（例えば、2'-Oメチル修飾）が付されたパッセンジャ

一鎖で構成されており、ガイド鎖はRNAi活性を示す一方でパッセンジャー鎖はRNAi活性を示さないため、細胞内の天然型のmiRNAを模倣することとなる。

[0063] 本発明で用いる、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAの標的タンパク質としては、例えば、NR6A1(Nuclear Receptor Subfamily 6 Group A Member 1)、TRIM71 (Tripartite Motif Containing 71)、IGF2BP1 (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein1)、VASH2 (Vasohibin-2)、DPH3 (Diphthamide Biosynthesis 3)などが挙げられる。NR6A1及び／またはTRIM71の活性を抑制することが特には好ましい。これらのうち、1種類のタンパク質を標的としてもよく、2種類以上のタンパク質を標的としてもよい。

[0064] let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAの標的タンパク質の活性を抑制する方法としては、特に限定されないが、ノックダウンによるタンパク質の発現を抑制する方法や、ノックアウトによりこれらのタンパク質をコードする遺伝子を改変する技術が挙げられる。ノックダウン方法としては、例えば、当該細胞に、siRNA、shRNAまたはアンチセンス核酸を導入する方法や、shRNAまたはアンチセンス核酸をコードするDNAを導入する方法などが挙げられる。上記DNAとしては、プラスミドなどの発現ベクターを用いることが好ましい。また、薬物による発現誘導可能な、shRNAまたはアンチセンス核酸をコードする発現ベクターを用いてもよい。ノックアウト方法としては、例えば、CRISPR/Cas9システムなどによるゲノム編集技術を用いる方法が挙げられる。

[0065] 細胞にlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入する、細胞で該miRNAを発現させる、および／または該miRNAの標的タンパク質の活性を抑制する時期や期間は、特に限定されないが、例えば、初期化因子を細胞に導入してから1日間以上であることが好ましく、3日間以上であることがより好ましく、5日間以上であることがさらに好ましい。上限については特に制限はないが、典型的には、ナイーブ型多能性幹細胞が得られる期間(例えば、19日間)以内である。

[0066] さらに、本発明の製法の工程(1)および本発明のナイーブ型多能性幹細胞の直接誘導法は、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入した細胞に

、さらに骨形成タンパク質または該タンパク質をコードする核酸を導入する工程、および／またはlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入した細胞を、骨形成タンパク質を含む培地で培養する工程を含んでいてもよい。以下、これらの工程を包含する用語として、「骨形成タンパク質を導入する工程」との用語を用いることがある。

[0067] あるいは、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを用いることなく、骨形成タンパク質を用いて体細胞からナイーブ型多能性幹細胞を直接誘導することもできる。よって、本発明のさらに別の態様において、初期化因子および骨形成タンパク質を導入した体細胞を、ナイーブ型多能性幹細胞維持培地中で培養する工程を含む、ナイーブ型多能性幹細胞の製造方法も提供される。かかる工程は、具体的には、例えば、骨形成タンパク質または該タンパク質をコードする核酸を導入する工程、体細胞を、骨形成タンパク質を含む培地で培養する工程などにより行うことができる。これらの工程も、「骨形成タンパク質を導入する工程」に含まれものとする。

[0068] 初期化因子および骨形成タンパク質を導入した体細胞は、初期化因子と骨形成タンパク質とを同時に体細胞に導入することにより準備してもよく、あらかじめ初期化因子を入れた体細胞に、期間を開けて骨形成タンパク質を導入することにより準備してもよく、あるいは、あらかじめ骨形成タンパク質を導入した体細胞に、期間を開けて初期化因子を導入することにより準備してもよい。また、初期化因子および／または骨形成タンパク質の体細胞への導入は、1回でもよく、複数回（例：2回、3回、4回、5回またはそれ以上）であってもよい。

[0069] 本発明に用いる骨形成タンパク質（Bone Morphogenetic Proteins）としては、例えば、BMP2、BMP4、これらの類似体もしくは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、骨形成タンパク質は、ヒト骨形成タンパク質である。培地に添加する骨形成タンパク質は、組み換えタンパク質であってもよい。培地に骨形成タンパク質を添加する場合に、該タンパク質の培地中での濃度は、典型的には、5 ng/mL～100 ng/mLであり、好ましく

は5 ng/mL～10 ng/mLである。

- [0070] 骨形成タンパク質の導入方法は、合成タンパク質分子を直接細胞にトランスフェクションする方法のほか、骨形成タンパク質をコードするmRNAを合成RNA分子の形態で細胞に導入する方法、骨形成タンパク質をコードするDNAを細胞に導入する方法が挙げられる。合成タンパク質分子を直接細胞にトランスフェクションする方法は、任意のトランスフェクション試薬を用いることができる。
- [0071] さらに、骨形成タンパク質を導入する工程に代えて、または該工程と合わせて、細胞における骨形成タンパク質を活性化する工程を行うこともできる。かかる工程は、典型的には、骨形成タンパク質活性化物質を、培地に添加する工程により行うことができる。培地に骨形成タンパク質活性化物質を添加する場合に、該物質の培地中での濃度は、物質の種類にもよるが、典型的には、7 μ M～50 μ Mである。
- [0072] 骨形成タンパク質活性化物質は、細胞内在性の骨形成タンパク質の活性を向上させる物質であってもよく、骨形成タンパク質を導入する工程において外部から添加した骨形成タンパク質の活性を向上させる物質であってもよい。かかる骨形成タンパク質活性化物質としては、例えば、SB-4（CAS登録番号：100874-08-6）、イソリキリチゲニン（CAS登録番号：961-29-5）などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0073] 細胞に骨形成タンパク質を導入する、細胞で該タンパク質を発現させる、および／または該タンパク質を活性化する時期や期間は、特に限定されないが、例えば、初期化因子を細胞に導入してから1日間以上であることが好ましく、3日間以上であることがより好ましく、5日間以上であることがより好ましい。上限については特に制限はないが、典型的には、ナイーブ型多能性幹細胞が得られる期間（例えば、19日間）以内である。また、初期化因子を細胞に導入してから1日後に骨形成タンパク質を培地に添加する（例えば、5ng/mL～10ng/mLの濃度となるように添加する）ことも好ましい態様である。
- [0074] 発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデ

ノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター、プラスミドベクター、エピソードベクター、人工染色体ベクター、トランスポゾンベクター(piggyBac, piggyBat, TolII)などが挙げられる。発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、例えば、EF1 α プロモーター、ACTBプロモーター、UbqCプロモーター、PGKプロモーター、CAGプロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニー Maus 白血病ウイルス）LTR、HIV LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。一方で、miRNA、shRNAまたはアンチセンス核酸をコードするDNAを含む発現ベクターにおいては、プロモーターとしては、pol III系のプロモーター（例、SNR6、SNR52、SCR1、RPR1、U3、U6、H1プロモーター等）が好ましい。

[0075] mRNAやmiRNAなどのRNAは、化学合成により作製してもよく、またインビトロ転写反応（IVT）法により作製することもできる。あるいは、生物内（大腸菌や哺乳類培養細胞）で発現させたものを精製することもできる。化学合成方法としては、例えば、ヌクレオシドホスホロアミダイトと固相担体を用いた方法などが挙げられる。また、化学修飾が導入されたヌクレオシドホスホロアミダイト（例えば、糖部の2' -O-メチル化ホスホロアミダイトなど）を用いることで、RNA配列の任意の塩基部位に修飾ヌクレオチドを導入することができる。

[0076] 核酸（例えば、上述のmRNA、miRNA、これらをコードするDNA等）、該核酸を含む発現ベクターまたはタンパク質（例えば、初期化因子）の細胞への導入は、公知の種々の方法によって行うことができる。かかる方法として、例えば、リン酸カルシウム仲介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、リポフェクション、遺伝子銃、マイクロインジェクション、ウイルスベクター法、ウイルス様粒子法、アグロバクテリウム法、アグロインフィルトレーション法、PEG-カルシウム法、ソ

ノボレーション法、脂質ナノ粒子法などが挙げられる。

[0077] 体細胞に初期化因子を導入し、ナイーブ型多能性幹細胞を製造する期間は特に制限されないが、通常9日間以上であり、14日目以上が好ましく、19日間以上がより好ましく、25日以上がさらにより好ましい。上限についても特に制限はないが、典型的には70日間(約20継代)以下である。

[0078] 本発明の製法の工程(2)は、ナイーブ型多能性幹細胞を、プライム型多能性幹細胞維持培地で培養することにより行うことができる。かかる培地としては、プライム型多能性幹細胞を維持培養できれば限定できないが、典型的には、bFGFを含む培地である。bFGFを含む培地は、典型的には、下述の基礎培地にbFGFを添加することで調製することができる。このように、ナイーブ型多能性幹細胞から再度製造されたプライム型多能性幹細胞を、ナイーブ型多能性幹細胞の出発細胞としてのプライム型多能性幹細胞と区別するため、「リプライム型(re-primedまたはreprimed)多能性幹細胞」と称することがある。

[0079] 本発明の製法の工程(2)の培養期間は特に制限されないが、典型的には4日間以上(例:5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間またはそれ以上)である。bFGFを含む培地中では、リプライム型多能性幹細胞は維持増殖が可能であり、上限についても特に制限はないが、典型的には40日間以下であり、30日間以下が好ましい。

[0080] 本発明の製法における培養は、全部または一部の期間、フィーダーフリー条件下および／またはゼノフリー条件下での培養であってもよい。臨床での使用の観点からは、本発明の製法における培養は、全期間がフィーダーフリーかつゼノフリー条件下で行われることが好ましい。本明細書において、「フィーダーフリー」とは、培養対象の細胞の培養条件を整えるために用いる、補助役を果たす他の細胞種(即ち、フィーダー細胞)を含まない培地または培養条件を意味する。また、「ゼノフリー」とは、培養対象の細胞の生物種とは異なる生物由来の成分を含まない培地または培養条件を意味する。

[0081] 本発明の製法で用いる基礎培地としては、特に限定されないが、StemFit(

登録商標) AK02培地(味の素株式会社)、StemFit(登録商標) AK03培地(味の素株式会社)、StemFit(登録商標) Basic03培地、CTS(登録商標) KnockOut SR XenoFree Medium(Gibco)、mTeSR1培地、TeSR1培地(Stem Cell Technologies)、Iscove's modified Dulbecco's medium(GEヘルスケア社)、Improved MEM(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)などが挙げられる。これらの培地は、フィーダーフリーかつゼノフリー条件下での培養に用いることもできる。また、RPMI-1640培地、EagleMEM(EMEM)、ダルベッコ改変MEM、Glasgow's MEM(GMEM)、 α -MEM、199培地、IMDM、DMEM、Hybridoma Serum free培地、KnockOut™ DMEM、Advanced TM培地(例: Advanced MEM、Advanced RPMI、Advanced DMEM/F-12)、Ham's Medium F-12、Ham's Medium F-10、Ham's Medium F12K、DMEM/F-12、ATCC-CRCM30、DM-160、DM-201、BME、Fischer、McCoy's 5A、Leibovitz's L-15、RITC80-7、MCDB105、MCDB107、MCDB131、MCDB153、MCDB201、NCTC109、NCTC135、Waymouth's Medium(例: Waymouth's MB752/1)、CMRL培地(例: CMRL-1066)、Williams' medium E、Brinster's BMOc-3 Medium、E8 Medium、StemPro 34、MesenPRO RS(以上サーモフィッシャーサイエンティフィック社)、ReproFF2、Primate ES Cell Medium、ReproStem(以上リプロセル株式会社)、ProculAD(ロート製薬株式会社)、MSCBM-CD、MSCGM-CD(以上Lonza社)、EX-CELL302培地(SAFC社)またはEX-CELL-CD-CHO(SAFC社)、ReproMed™ iPSC Medium(リプロセル株式会社)およびこれらの混合物などが挙げられるが、これらに限定されない。

- [0082] 必要に応じて、培地は、上記以外の培地添加物、例えば、ROCK阻害剤、Knockout Serum Replacement(KSR)、N2サプリメント(Invitrogen)、B27サプリメント(Invitrogen)、アルブミン、トランスフェリン、アポトランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよく、また、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax(Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、

ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、セレン酸、プロゲステロンおよびブトレシンなどの1つ以上の物質も含有してもよい。一態様において、基礎培地に対し、bFGFと20種の必須アミノ酸、10種のビタミン(L-Ascorbic Acid, Cobalamin, Biotin, Folic Acid, I-inositol, Niacinamide, D-Calcium Pantothenate, Pyridoxine Hydrochloride, Riboflavin and Thiamine Hydrochloride)、5つのミネラル(Cupric Sulfate, Ferric Sulfate, Ferric Nitrate, Zinc Sulfate and Sodium selenite)を添加したものをプライム型多能性幹細胞維持培地として用いることもできる (Scientific Reports volume 4, Article number: 3594 (2014))。

[0083] 本発明の製法における培養は、浮遊培養、接着培養のいずれであってもよいが、好ましくは接着培養である。本明細書において、「浮遊培養」とは、細胞または細胞の凝集体が培養液に浮遊して存在する状態を維持する条件で行われる培養、即ち細胞または細胞の凝集体と培養容器との間に強固な細胞-基質間結合 (cell-substratum junction) を作らせない条件での培養を意味する。また、本明細書において、「接着培養」とは、細胞または細胞の凝集体と培養器材等との間に強固な細胞-基質間結合を作らせる条件での培養をいう。

[0084] 接着培養を行う際に用いられる培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理 (例: 基底膜調製物、フィブロネクチン、ラミニンまたはその断片、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン、シンセマックス、ビトロネクチン等の細胞外マトリクス等、または、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等によるコーティング処理、または、正電荷処理等の表面加工) されたものが挙げられる。中でも、ラミニンまたはその断片でコーティングした培養器が好ましい。

[0085] 本発明で用いるラミニンまたはその断片としては、ラミニン-111およびそのE8領域を含む断片、ラミニン-211およびそのE8領域を含む断片 (例: iMatrix-211)、ラミニン-121またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-221またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-332またはそのE8領域を含む断片、ラミニ

ン-3A11またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-411またはそのE8領域を含む断片（例：iMatrix-411）、ラミニン-421またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-511またはそのE8領域を含む断片（例：iMatrix-511、iMatrix-511 silk）、ラミニン-521またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-213またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-423またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-523またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-212/222またはそのE8領域を含む断片、ラミニン-522またはそのE8領域を含む断片などが挙げられる。

- [0086] 浮遊培養を行う際に用いられる培養容器は、「浮遊培養する」ことが可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このような培養容器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、またはローラーボトルが挙げられる。さらに、浮遊培養用の容器としてバイオリアクターが例示される。これらの培養容器は、浮遊培養を可能とするために、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養容器としては、培養容器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例：細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないものなどを使用できる。
- [0087] 培養温度は、特に制限されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2～5%である。
- [0088] 細胞の培養密度は、細胞が増殖できる限り特に限定されない。通常 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/cm²、好ましくは $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/cm²、より好ましくは $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 細胞/cm²である。
- [0089] また、本発明の製法は、工程（2）で得られたプライム型多能性幹細胞を回収する工程を含んでいてもよい。かかる工程は、例えば、細胞を細胞解離酵素（例えば、トリプシンやトリプシン代替品（例：TrypLE™ Select等）な

ど)で処理した上で、セルスクレーパーで培養容器から細胞を剥がし、剥がした細胞を、ピペットを用いてチューブ等の容器に回収することなどにより行うことができる。容器に回収した細胞は、別の培養容器に継代してもよく、分化誘導を行ってもよく、あるいは細胞凍結保存液(例:STEM-CELLBANKER等)を用いて凍結保存してもよい。また、容器に回収した細胞は、セルカウンターにてセルカウントを行ってもよく、プライム型多能性幹細胞の表面マーカー(例:CD24、CD90等)に対する抗体により標識し、フローサイトメトリーやマスサイトメトリー、磁気細胞分離法などにより精製してもよい。

[0090] 2. 多能性幹細胞の分化能力向上法

上述の通り、プライム型多能性幹細胞にナイーブ化処理を行うことで、多能性幹細胞の分化能力を向上させることができる。よって、本発明の別の態様において、(1)プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞を誘導する工程、および(2)前記工程(1)で誘導したナイーブ型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程を含む、多能性幹細胞の分化能力を向上させる方法(以下、「本発明の分化能力向上法」と称することがある。)が提供される。

[0091] 本発明の分化能力向上法の工程(1)は、細胞集団からCD320陽性細胞を選別する工程を含んでもよい。本発明の分化能力向上法は、工程(2)で培養された多能性幹細胞を回収する工程を含んでもよい。また、本発明の分化能力向上法における培養は、全部または一部の期間、フィーダーフリー条件下および/またはゼノフリー条件下での培養であってもよい。臨床での使用の観点からは、本発明の分化能力向上法における培養は、全期間がフィーダーフリーかつゼノフリー条件下で行われることが好ましい。

[0092] 本発明の分化能力向上法における、用いられる細胞、培養期間や用いられる培地の種類を含む培養方法や培養条件、各工程における具体例や定義等は、上記「1. プライム型多能性幹細胞の製法」で記載した内容がすべて援用される。

[0093] 3. 分化誘導法および該方法で得られた分化細胞

上述の通り、本発明の多能性幹細胞は、高い分化能力を有するため、様々な細胞への分化に好適に用いることができる。よって、本発明の別の態様において、本発明の多能性幹細胞を分化誘導させる工程を含む、細胞またはオルガノイドの製造方法（以下、「本発明の分化誘導法」と称することがある。）が提供される。

[0094] 本発明の分化誘導法により得られる細胞は、幹細胞や前駆細胞などの未分化細胞であってもよく、最終分化細胞であってもよい。以下で、未分化細胞と最終分化細胞の両方を包含する用語として、「分化細胞」との用語を用いることがある。また、生殖細胞であってもよい。本明細書において、「未分化細胞」とは、細胞系譜において、最終分化に至っていない細胞を意味し、未分化細胞としては、例えば、多能性幹細胞を除く幹細胞、前駆細胞などが挙げられる。幹細胞または前駆細胞としては、例えば、エピブラスト様細胞、始原生殖細胞（「始原生殖細胞様細胞」とも称する。）、生殖幹細胞、外胚葉系列の細胞である神経堤細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、網膜幹細胞、角膜幹細胞、ケラチノサイト表皮幹細胞、メラノサイト幹細胞、乳腺幹細胞、中胚葉系列の細胞である造血前駆細胞、骨髓系幹細胞、リンパ系幹細胞、B前駆細胞、T前駆細胞、間葉系幹細胞、心臓幹細胞、心臓前駆細胞、血管内皮前駆細胞、血管周皮細胞、血小板前駆細胞（例：巨核球前駆細胞、巨核芽球、前巨核球、成熟巨核球等）、骨格筋幹細胞、脂肪幹細胞、腎前駆細胞、内胚葉系列の細胞である肝幹細胞、肝臓前駆細胞（例：肝芽細胞、肝前駆細胞、肝星細胞前駆細胞、肝幹前駆細胞等）、腸幹細胞、気道幹細胞などが挙げられる。

[0095] 本明細書において、「最終分化細胞」とは、細胞系譜において、最終分化に至った細胞を意味し、最終分化細胞としては、特に限定されないが、例えば、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肝細胞、肝中皮細胞、胆管上皮細胞、肝星細胞、肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、ピット細胞、血管内皮細胞、血液細胞（例：赤血球、血小板、白血球、肥満細胞、樹状細胞等）、膵管上皮細胞、膵導管細胞、腺房中心細胞、腺房細胞、ランゲルハンス島、心筋細胞

、線維芽細胞、平滑筋細胞、I型肺胞上皮細胞、II型肺胞上皮細胞、クララ細胞、線毛上皮細胞、基底細胞、杯細胞、神経内分泌細胞、クルチッキー細胞、尿細管上皮細胞、尿路上皮細胞、円柱上皮細胞、糸球体上皮細胞、糸球体内皮細胞、蛸足細胞、メサングウム細胞、神経細胞、グリア細胞（例：アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、シュワン細胞等）などが挙げられる。白血球としては、リンパ球（例：B細胞、T細胞、NK細胞等）、顆粒球（例：好中球、好酸球、好塩基球等）、単球などが挙げられる。

[0096] 本発明の一実施態様において、本発明の分化誘導法により得られる細胞やオルガノイド（目的の細胞またはオルガノイド）は、神経堤細胞、神経前駆細胞、神経細胞、造血前駆細胞、血小板、T細胞、エピブラスト様細胞、始原生殖細胞または心筋細胞である。

[0097] また、本明細書において、「オルガノイド」とは、細胞が集積して形成された構造体を意味し、典型的には、生体内の臓器と類似した構造及び機能を有する。本発明の分化誘導法により得られるオルガノイドとして、例えば、神経オルガノイド（例：大脳皮質オルガノイド、小脳オルガノイド、脊髄オルガノイド、中脳オルガノイド、脈絡叢オルガノイド、海馬オルガノイド、視床下部オルガノイド、脳下垂体前葉オルガノイド、大脳基底核オルガノイド、網膜オルガノイド等）、肺オルガノイド、肝オルガノイド、気道上皮オルガノイド、腸オルガノイド、膵臓オルガノイド、腎臓オルガノイド、気道オルガノイド、胃オルガノイド、甲状腺オルガノイド、胸腺オルガノイド、精巣オルガノイド、食道オルガノイド、皮膚オルガノイド、卵管オルガノイド、卵巣オルガノイド、唾液腺オルガノイド、眼胞オルガノイド、眼杯オルガノイド、膀胱オルガノイド、前立腺オルガノイド、軟骨オルガノイド、心臓オルガノイド、骨組織オルガノイド、筋組織オルガノイド、がんオルガノイドなどが挙げられるが、一実施態様において、大脳皮質オルガノイドなどの神経オルガノイドである。

[0098] ある構造体がオルガノイドであるかどうかは、例えば、顕微鏡観察により

層構造形成の有無の確認や、マーカータンパク質の発現を調べることで確認することができる。具体的には、大脳皮質オルガノイドの場合には、Foxg1が全体に発現したドーム状の神経上皮が認められ、該神経上皮は層構造を形成する。前記構造において、典型的には、上皮の内側にPax6、Sox2陽のventricular zoneに相当する神経前駆細胞の層が、その外側に、Reelin/Calretinin陽性のCajal Retzius細胞からなる第1層や、Ctip2/Tbr1陽性のdeep layerなどが認められる。また、肝オルガノイドでは、HHEX、SOX2、HNF4A、AFP、ALBなどがマーカーになり、膵臓オルガノイドでは、PDX1、SOX17、SOX9などがマーカーになり、腸管に分化するオルガノイドでは、CDX2、SOX9などがマーカーになり、腎臓オルガノイドでは、Pax2、Six2などがマーカーになる。

[0099] 目的の細胞またはオルガノイドを得るための分化誘導方法は、下述の実施例で記載の方法や、公知の方法を用いることができる。例えば、多能性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導は、Fukuta M. et al., PLoS One, 2014, 9(12): e112291やKamiya D, et al., NPJ Regen Med., 2022 Sep 15;7(1): 47に記載の方法などにより行うことができる。具体的には、多能性幹細胞を培養容器に播種して接着培養した後、TGF β 阻害剤及びGSK3 β 阻害剤を含む培地で接着培養することで神経堤細胞に分化させることができる。

[0100] 神経堤細胞から、間葉系幹細胞、神経前駆細胞、神経細胞、グリア細胞、骨細胞、軟骨細胞、角膜細胞、メラノサイトなどの細胞を製造することもできる。例えば、これらの細胞への分化誘導は、Fukuta M. et al., PLoS One, 2014, 9(12): e112291、Horikiri T. et al., PLoS One, 2017, 12(1): e0170342、Kamiya D, et al., NPJ Regen Med., 2022 Sep 15;7(1):47に記載の方法などに基づいて行うことができる。具体的には、例えば、神経堤細胞をFibronectinでコーティングしたプレートに播種し、N-2 Supplement、BDNF、GDNF、NT-3、NGFを添加したDMEM/F12に交換し、37°C、5%CO₂下で約14日間培養することで、神経前駆細胞および神経細胞を得ることができる。あるいは、神経堤細胞をプレートに播種し、SB431542およびCHIR99021を含むCDM培地で1日間培養した後、B-27 Supplement、N-2 Supplement、L-glutamine、Penicil

lin/Streptomycin、BDNF、GDNF、NT-3、NGFを添加したNeurobasal mediumに交換し、37℃、5%CO₂下で約35日間培養することで、神経前駆細胞および神経細胞を得ることができる。

- [0101] また、間葉系間質細胞への分化誘導は、例えば、次の方法などが挙げられる。神経堤細胞を培養容器に播種し、SB431542およびCHIR99021を含むCDM培地で1日間培養する。1日後、培地を、FBSを含む α MEMに交換する。分化誘導開始約14日後に、間葉系間質細胞を得ることができる。
- [0102] 多能性幹細胞をT細胞に分化させる方法として、例えば、(1)多能性幹細胞を、造血前駆細胞に分化させる工程、及び(2)該造血前駆細胞をT細胞に分化させる工程を含む方法が挙げられる。前記工程(1)は、例えば、W02013/07522 2、W02016/076415、Liu S. et al., Cytotherapy, 17 (2015);344-358などに記載されているように、造血前駆細胞への誘導培地中で多能性幹細胞を培養する工程であり得る。また、前記工程(2)は、W02016/076415などに記載されているような、(2-1)造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程、及び(2-2)CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を誘導する工程であり得る。
- [0103] 多能性幹細胞を血小板に分化誘導させる工程は、例えば、(1)多能性幹細胞を造血前駆細胞に分化させる工程、および造血前駆細胞を血小板に分化させる工程を含む方法が挙げられる。前記工程(2)は、例えば、W02012/157586、US2014/127815、Nakamura, Eto, et al. Cell Stem Cell 14, 535-548 (2014)などに記載されているように、TP0および／またはSCFを含む培地で造血前駆細胞を7～15日間程度培養する工程であり得る。この工程により、巨核球および血小板を含む細胞集団を得ることができる。
- [0104] 多能性幹細胞を始原生殖細胞に分化誘導させる工程は、例えば、W02017/002888などに記載されているように、(1)多能性幹細胞を、アクチビンAおよびGSK3 β 阻害剤を含む培養液中で40時間～60時間程度培養してエピブラスト様細胞に分化させる工程、および(2)エピブラスト様細胞を、BMPを含む培養液中で4～8日間程度培養して始原生殖細胞（始原生殖細胞様細胞）に分化させる工程を含む方法が挙げられる。

- [0105] 多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導としては、例えば、W02015/141827、Laflamme MA and Murry CE, Nature. 473(7347):326-35 (2011)などに記載の方法などが挙げられる。この他にも、例えば、人工多能性幹細胞を浮遊培養により胚様体を形成させて心筋細胞を製造する方法、BMPシグナル伝達を抑制する物質の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02005/033298)、Activin AとBMPを順に添加させて心筋細胞を製造する方法 (W02007/002136)、カノニカルWntシグナル経路の活性化を促す物質の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02007/126077) などが挙げられる。
- [0106] 神経オルガノイドは、例えば、Sasai Y. et al., Cell Stem Cell. 12:520-530 (2013)、Sakaguchi H. et al., Nat Commun. 6:8896 (2015)などに記載されたように、SFEBq法によって誘導した神経前駆細胞を含む細胞凝集体（典型的には、分化誘導開始から18日目程度で形成される）を、目的の神経細胞分化誘導培地で培養することで製造することができる。かかる神経細胞分化誘導培地で細胞凝集体を、浮遊培養条件下で培養を続けることで、神経オルガノイドは自己組織化的に誘導され得る。SFEBq法では、典型的には、分化誘導初日 (Day 0) に、酵素で分散したプライム型多能性幹細胞を、Wntシグナル阻害剤、TGF- β 阻害剤、およびROCK阻害剤を含む培地で浮遊培養し、Day 1以降はWntシグナルの阻害剤、TGF- β 阻害剤を含む培地で培養する工程が含まれる。
- [0107] SFEBq法で用いるWntシグナル阻害剤としては、例えば、DKK1タンパク質、スクレロスチン、IWR-1e、IWP-2、IWP-3、IWP-4、IWP-L6、C59、ICG-001、FH 535、WIKI4、KY02111、PNU-74654、XAV939、これらの誘導体などが挙げられる。TGF- β 阻害剤としては、例えば、Lefty-1、SB431542、SB202190、SB505124、NPC30345、SD093、SD908、SD208、LY2109761、LY364947、LY580276、A-83-01、これらの誘導体などが挙げられる。ROCK阻害剤については、上述のものと同様のものが挙げられる。
- [0108] 神経細胞分化誘導培地としては、例えば、大脳皮質オルガノイドを誘導するためのN2培地 (DMEM/F12培地にN2サプリメントを添加して作製した培地)

、脈絡叢オルガノイドを誘導するためのCHIR99021およびBMP4を含む培地、下垂体オルガノイドを誘導するためのSAG、BMP4およびKSRを含む培地などが挙げられるが、これらに限定されない。オルガノイドを誘導する途中で、適宜神経細胞分化誘導培地を変更してもよい。

[0109] また、複数種類の細胞を用いて、オルガノイドを製造することもできる。例えば、肝オルガノイドの場合には、W02013/047639などに記載されているように、多能性幹細胞から、肝前駆細胞（臓器細胞）、間葉系幹細胞、および血管内皮細胞を誘導し、これらの混合物を浮遊培養することで、肝オルガノイドを製造することができる。

[0110] 本発明の分化誘導法は、全部または一部の期間、フィーダーフリー条件下および／またはゼノフリー条件下での培養であってもよい。臨床での使用の観点からは、本発明の分化誘導法における培養は、全期間がフィーダーフリーかつゼノフリー条件下で行われることが好ましい。

[0111] また、別の態様において、本発明の分化誘導法により得られた細胞またはオルガノイド（以下、「本発明の分化細胞またはオルガノイド」とも称することがある。）が提供される。

[0112] 本発明の分化誘導法は、得られた目的の細胞またはオルガノイドを回収する工程を含んでもよい。回収した細胞は、細胞凍結保存液を用いて凍結保存してもよい。また、容器に回収した細胞は、セルカunterにてセルカウントを行ってもよく、細胞の表面マーカーに対する抗体により標識し、フローサイトメトリーやマスサイトメトリー、磁気細胞分離法などにより精製してもよい。

[0113] 本発明の分化誘導法における、用いられる細胞、培養期間や用いられる培地の種類を含む培養方法や培養条件、回収方法の具体例や定義等は、上記「1. プライム型多能性幹細胞の製法」で記載した内容がすべて援用される。

[0114] 4. 分化細胞またはオルガノイドの用途

本発明の分化細胞またはオルガノイドは、免疫療法や再生医療に好適に用いることができるため、別の態様において、本発明の分化細胞またはオルガ

ノイドを含有してなる医薬（以下、「本発明の医薬」と称することがある。）が提供される。本発明の医薬としては、例えば、免疫療法剤や細胞移植剤の形態の剤で提供される。また、本発明の分化細胞またはオルガノイドの有効量を、治療の対象とする霊長類動物に投与または移植する、疾患の治療方法も、本発明に包含される。霊長類動物の具体例は、上記「1. プライム型多能性幹細胞の製法」に記載した通りであるが、好ましくはヒトである。

[0115] 本発明の分化細胞またはオルガノイドは、それを必要とする対象に生体内に投与または移植して用いることができる。移植は、細胞を一定の位置で固定できる生体内領域に行うことが好ましく、例えば、皮下、腹腔内、腹膜上皮、大網、脂肪組織、筋肉組織や脾臓、腎臓等の各臓器の被膜下などに行うことができる。好ましくは、侵襲度の低い皮下移植である。移植される細胞は、治療上有効量を投与すればよく、移植対象の、年齢、体重、移植部位の大きさ、疾患の重篤度等の要因により変化し得、特に限定されないが、例えば、 10×10^4 細胞～ 10×10^{11} 細胞程度とすることができる。

[0116] 本発明の分化細胞またはオルガノイドを、医薬として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一若しくは実質的に同一である体細胞から樹立したiPS細胞に由来する細胞またはオルガノイドを用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座或いはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。年齢や体質などの理由から十分な細胞が得られない場合には、ポリエチレングリコールやシリコンのようなカプセル、多孔性の容器などに包埋して拒絶反応を回避した状態で移植することも可能である。

[0117] 本発明の分化細胞またはオルガノイドは、常套手段にしたがって医薬上許容される担体と混合するなどして、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造される。従って、一態様において、本発明の分化細胞またはオルガノイドを製剤化する工程を含む、免疫療法剤または細胞移植療法剤の製法

も提供される。かかる製法は、本発明の分化細胞またはオルガノイドを準備する工程を含んでいてもよい。さらに、本発明の分化細胞またはオルガノイドを保存する工程を含むこともできる。

[0118] 当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げることができる。本発明の細胞は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などと配合してもよい。

[0119] 本発明の免疫療法剤または細胞移植療法剤は、細胞の凍結保存に通常使用される条件で凍結保存された状態で提供され、用時融解して用いることもできる。その場合、血清若しくはその代替物、有機溶剤（例、DMSO）等をさらに含んでいてもよい。この場合、血清若しくはその代替物の濃度は、特に限定されるものではないが約1～約30%(v/v)、好ましくは約5～約20%(v/v)であり得る。有機溶剤の濃度は、特に限定されるものではないが0～約50%(v/v)、好ましくは約5～約20%(v/v)であり得る。

[0120] また、本発明の分化細胞またはオルガノイドは、疾患の治療または予防に有用な薬剤である候補薬剤をスクリーニングする方法にも用いることができる。

[0121] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

実施例

[0122] 実施例 1：プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞（リセット細胞）への誘導

1. リセット細胞への誘導

ヒトプライム型多能性幹細胞ライン（H9ES細胞、H1ES細胞、AdiPS、1383iPS細胞等由来）から既報の方法（非特許文献1～3）で、リセット細胞を誘導

した（培養スケール：6 well plate）。具体的には、以下の方法でリセット細胞を誘導した。

- [0123] ヒトプライム型多能性幹細胞(PSC)ライン(H9ES(胚性幹)細胞、H1ES細胞、AdiPS細胞)はConventional condition (F12/KSRと呼ぶ) (Dulbecco's modified Eagle medium [DMEM/F12; ナカライテスク, Cat.08460-95]、20%[v/v] KSR [Thermo Fisher Scientific, Cat. 10828028]、nonessential amino acids [NEAA; Thermo Fisher Scientific, Cat. 11140-050]、4 ng/ml recombinant human bFGF [bFGF; オリエンタル酵母, Cat. NIB 47079000]、0.1 mM 2-mercaptoethanol [Sigma-Aldrich, Cat.M3148])を用い、 γ 線照射したMEF上で維持した。細胞は5〜7日毎にDissociation Buffer(DB; 0.025% Trypsin [Thermo Fisher Scientific, Cat. 15090-046]、1mg/ml Collagenase IV [Thermo Fisher Scientific, Cat. 17104-019]、20%KSR、1mM CaCl_2)を用い、小さなクランプ様に剥離し継代した。
- [0124] ヒトナীব型多能性幹細胞ライン(H9ES細胞、H1ES細胞、AdiPS細胞由来)はt2iLGo(Ndiff227[Takara Bio, Cat. Y40002]、1 μM PD0325901 [PD03; Tocris, Cat.4192]、1 μM CHIR99021[CH; Sigma-Aldrich, Cat.SML1046]、10ng/ml Recombinant human LIF [hLIF; Peprotech, Cat.300-05]、3 μM Go6983[Go; Tocris, Cat.2285])を用いMEF上で維持した。細胞は3〜5日毎にAccutase(Sigma-Aldrich, Cat.A6964)を用い剥離し継代した。
- [0125] ナীব型H9PSCは、HDAC阻害剤を用いた方法で樹立した (Guo, G. et al. (2017). Development 144(15): 2748-2763.)。HDAC阻害剤を用いて樹立する方法を、ケミカルリセット法とも称する。樹立に際して、プライム型H9PSCにエレクトロポレーションによりE0Sプラスミドを導入した(プライム型H9 E0S)。プラスミドには薬剤耐性マーカーとなる遺伝子(ピューロマイシン耐性)を組み込み、細胞への導入後、Puromycin Dihydrochloride(Thermo Fisher Scientific, Cat.A1113802)を用いて薬剤選択を行うことにより、プラスミドの導入された細胞を選抜した。プライム型H9 E0Sをトリプシン/EDTA(ナカライテスク, Cat.32777-15)により単一な細胞へと剥離し、 1×10^5 個/cm²の

細胞を $10\mu\text{M}$ Y-27632(Wako, Cat. 034-24024)を加えたF12/KSR培地でMEF上へと播種した。翌日からcRM1(Ndiff, $1\mu\text{M}$ PD03, 10ng/ml hLIF, 1mM Valproic acid sodium salt [VPA; Sigma-Aldrich, Cat.P4543])で48時間培養し、その後cRM2(Ndiff, $1\mu\text{M}$ PD03, 10ng/ml hLIF, $2\mu\text{M}$ Go, $2\mu\text{M}$ XAV939[Sigma-Aldrich, Cat.X3004])で細胞を維持した。3-5継代(約20日目)頃から大半の細胞がドーム状の形態を示すコロニーを形成する。この時点で、t2iLGo培地へと切り替え培養することで樹立した。

[0126] 一部の実験では5iLFAコンディションを用いてナীব型H9を樹立した(Theunissen et al., Cell Stem Cell. 2016 Oct 6;19(4):502-515.)。プライム型H9をトリプシン/EDTAにより単一な細胞へと剥離し、 1×10^5 個/cm²の細胞を $10\mu\text{M}$ Y-27632を加えたF12/KSR培地でMEF上へと播種した。翌日から5iLFA培地(Ndiff, $1\mu\text{M}$ PD03, $1\mu\text{M}$ CH, $1\mu\text{M}$ WH-4-023[A Chemtek H620061], $0.5\mu\text{M}$ SB590885[R and D 2650], $10\mu\text{M}$ Y-27632, 10ng/ml hLIF, 20ng/ml Activin A[R&D, Cat.388-AC], 8ng/ml bFGF)に変更し培養を続けた。大半の細胞がドーム状の形態を示すコロニーを形成した時点で(3-5継代(約20日目))、t2iLGoへと切り替え維持することで樹立した。

[0127] また、Feeder Free条件下でのナীব型多能性幹細胞誘導は、次の方法により行うことができる。誘導開始2日前 (Day-2) に維持培養しているPrimed iPSもしくはES細胞の細胞形態を確認する(図1のプライム細胞と同様の形態)。iMatrix511($0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)にてコーティングプレートを準備する。次に、Primed iPS or ES細胞に最終濃度 $10\mu\text{M}$ Y27632を添加後1時間以上インキュベートしておく。Accutaseにより細胞を剥離し、15mL tubeに1mL分取しておいたwash buffer中に回収する。遠心後、AK02N+Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$)で再懸濁し、セルカウトを実施する。上述のコーティング済みプレートにAK02N+Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$)を $1.5\text{mL}/\text{well}$ 分注し、 1×10^5 cells/wellを播種する。 37°C 、5%O₂、5%CO₂で培養を開始する。誘導開始前日 (Day-1) では培地交換は行わない。分化誘導開始Day0 (0時)、PBSで培養細胞を1回洗浄し、cRM-1+Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$) ($1.5\text{mL}/\text{well}$)に培地交換する。Day1 (24時間後) では培地

交換は行わない。Day2（48時間後）にcRM-1+ Y27632（最終濃度 $10\mu\text{M}$ ）（ $1.5\text{mL}/\text{well}$ ）に培地交換をする。Day3（72時間後）にPBSで培養細胞を1回洗浄し、cRM-2+ Y27632（最終濃度 $10\mu\text{M}$ ）（ $1.5\text{mL}/\text{well}$ ）に培地交換する。Day3から1st passageまで隔日でcRM-2+ Y27632（最終濃度 $10\mu\text{M}$ ）（ $1.5\text{mL}/\text{well}$ ）で培地交換を実施する。Day9からDay12にドーム状のナীব型多能性幹細胞細胞様のコロニーが出現する（例えば、図1のday9のようなコロニー）のを確認し1st passageを実施する。

[0128] 1st passageでは、iMatrix511（ $0.13\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）にてコーティングプレートを用意する。PBSで培養細胞を1回洗浄しAccutase/EDTAにて細胞を剥離し、 15mL tubeに分注しているwash buffer中に回収する。遠心後cRM-2培地で細胞を懸濁し、トリパンブルーでセルカウントを実施する。準備しておいたコーティング済みプレートに、cRM-2+Y27632（最終濃度 $10\mu\text{M}$ ）を $1.5\text{mL}/\text{well}$ 分注し、 $1\times 10^5\text{ cells}/\text{well}$ の細胞を播種する。 37°C 、 $5\%\text{O}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ で培養開始する。Day1では培地交換は行わない。Day2からDay5は毎日cRM-2で $1.5\text{mL}/\text{well}$ で培地交換を実施する。

[0129] 2nd passage以降は細胞培養容器のプレコーティングは実施せず、iMatrix511を添加して培養する。PBSで培養細胞を洗浄し、TrypLE+CDSにて細胞を剥離し、 15mL tubeに分注しているwash buffer中に回収する。遠心後、cRM-2培地で再懸濁し、トリパンブルーでセルカウントを実施する。細胞培養容器にcRM-2+Y27632（最終濃度 $10\mu\text{M}$ ）を $1.5\text{mL}/\text{well}$ 分注し、 $1\times 10^5\text{ cells}/\text{well}$ の細胞を播種する。iMatrix511を $3.75\mu\text{L}/\text{well}$ （ $0.19\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）添加し手早く均一に細胞を播種する。 37°C 、 $5\%\text{O}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ で培養開始する。Day1では培地交換は行わない。Day2からDay5は毎日cRM-2で $1.5\text{mL}/\text{well}$ で培地交換を実施する。2nd passage以降はDay4から5日おきに継代を実施する。 $50\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 前後の小さなドーム状のナীব型多能性幹細胞が観察される（例えば、図1のDay14、Day19、Day24のような細胞）ようになり、2-3継代以上経過すると比較的均一な小さなドーム状のナীব型多能性幹細胞が観察される（例えば、図1のリセットのような細胞）。

[0130] 2. 表面抗原の推移の検証

ヒトプライム型多能性幹細胞ライン（H9ES細胞、H1ES細胞、AdiPS、1383iPS細胞等由来）から誘導されたナীব型多能性幹細胞のFlow Cytometers(FCM)解析を以下の方法にて実施した。

[0131] 培養中のnaive iPS細胞をPBSで2回洗浄し、TrypLE+CDSを加え細胞を剥離した。遠心後、Hanks buffer+Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$)に細胞を再懸濁し、FCM解析に必要な細胞数を1.5mLチューブに分取し、Hanks buffer + Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$)にて氷上で20分間ブロッキングを実施した。遠心後上清を除去し、解析に必要な抗体（CD24、CD57、SUSD2、CD75）を含むHanks buffer + Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$)で細胞を懸濁した。氷上で20分抗原抗体反応を実施し、細胞を洗浄後、Hanks buffer + Y27632(最終濃度 $10\mu\text{M}$)にDAPIを加え細胞を懸濁しFCM解析を実施した。

[0132] その結果、既報のマーカー遺伝子では、誘導9日目にはプライム型マーカーであるCD24、CD57を消失し、ナীব型マーカーであるSUSD2とCD75を発現することが判明した(図2のDay9)。

[0133] 3. 網羅的遺伝子発現解析

次に、網羅的遺伝子発現解析(RNAシーケンシング RNA-seq)および主成分分析(PCA)を実施した。具体的には、細胞からRNAを抽出し、200ngのトータルRNAから、イルミナのキットを用いてライブラリーを作った。NextSeq500を用いて、シーケンスを実施した。発現レベルは、edgeRを用いて、標準化し、解析した。

[0134] PCAから、誘導9日目の細胞(D9)と、リセット細胞とに遺伝子発現パターンに違いがあることが判明した(図3)。単一細胞RNAシーケンシング(scRNA-seq)を実施したところ、リセット細胞は、クラスター6(CL6)の細胞であり、CL6に一致した細胞は14日目付近でごくわずかに出現をはじめ、24日目には多くの細胞がリセット細胞となることが明らかとなった。以前報告されているよりも時間を要する結果であった(図4)。

[0135] 4. 原始内胚葉への分化能およびmiRNA発現の検証

リセット細胞は、胚体外細胞、すなわち原始内胚葉(卵黄囊)と栄養外胚葉(胎盤細胞)、に分化できるが、プライム型iPS細胞は分化できないことが知られている。原始内胚葉細胞への分化能力を調べた。BMP4 (Bone morphogenetic protein) およびFGF4 (Fibroblast growth factor 4) に加えて、PDGF-AA、IL-6、TGF β 阻害剤、Wntシグナル阻害剤およびレチノイン酸を用いて誘導したところ、scRNA-seqの結果と同様に、D15より胚体外細胞の一つである原始内胚葉への分化が起こることが明らかとなった(図5)。次に、qPCR発現解析により、リセット細胞で発現するマーカー遺伝子を探索したところ、表面抗原であるCD320を同定することに成功した(図6)。実際CD320はヒト着床前エピブラストで発現が高いことが知られている。ナイーブ化誘導中において、CD320は14日目付近で出現することが示された。またCD320陽性細胞を純化し、取り出すとCD320強陽性細胞はリセット細胞の形態と遺伝子発現を示した(図7)。一方、CD320弱陽性細胞は、分化した形態であり、リセット細胞に関わる遺伝子発現も弱く、原始内胚葉への分化能力も低いことが示された(図7)。

[0136] qPCR発現解析は、次のように行った。total RNAはRNeasy Kit(Qiagen, Cat. 74106)にて抽出し、1000ngのRNAからcDNAをSuperScriptIV(Thermo Fisher Scientific, Cat.18090050)とoligo-dTプライマーを用い合成した。Real-time PCRには、TaqMan probe、またはpowerUP Sybr Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を用いた。Real-time RT-PCR反応後の解析はQuantStudio Design&Analysis Software v1.4.1を用いて行った。

[0137] また、miRNAの発現に関し、miRNAスイッチを用いて活性を調べたところ、miR-520c-3p、miR-520hはリセット細胞分化と一致し、活性が上昇した(図8)。この解析には、EOS(Early Transposon promoter and Oct-4 (Pou5f1) and Sox2 enhancers) - GFPレポーター遺伝子が導入されたヒトプライム型H9細胞を用いた。EOS-GFPレポーター遺伝子は、Oct-4遠位エンハンサーに存在するOCT 3/4とSOX2の結合領域を持ち、ナイーブ状態において活性化され、GFPを発現する。すなわち、GFPは、体細胞やプライム型多能性幹細胞では発現せず、ナイーブ型多能性幹細胞になると発現する。EOS-GFP陽性細胞は14日目に発現を

はじめ、リセット細胞で発現することが明らかとなった(図9)。EOS-GFP陽性細胞の割合は14日目には既にコントロール（ヒトナイーブ型H9細胞）と同程度に達していた(図9)。

[0138] 以上より、プライム型からナイーブ型への誘導において、真にリセット細胞になりえるのは14日以降であることを示し、リセット細胞として利用可能なマーカー（CD320）の同定に成功したといえる。

[0139] 本実施例で用いた試薬は以下の表2の通りである。本実施例において、播種細胞数は細胞株によって異なり、 0.5×10^5 から 5×10^5 細胞/well程度であった。表2に記載の試薬と同等の性能を持つものであれば、試薬の種類や試薬メーカーを変更してもよい。また、培養容器のコーティング剤は、iMatrix511だけでなく、ラミニン、ビトロネクチン、ファイブロネクチン、マトリゲル、geltrexなど一般的にプライム型iPS細胞が培養できるとされているものであれば、同様に使用できる。MEF上で培養することも可能である。

[0140]

[表2]

Chemical Resetting Medium 1: cRM-1

Takara Ndiff227	Takara	10ml
PD0325901 (stock:10mM)	TOCRIS #4192	1 μ l (final:1 μ M)
Human LIF (stock:10 μ g/ml)	Peprotech #300-05-1mg	10 μ l (final:10ng/ml)
VPA (stock:0.3M)	SIGMA #P4543-10G	33 μ l (final:1mM)

Chemical Resetting Medium 2: cRM-2

Takara Ndiff227	Takara	10ml
PD0325901 (stock:10mM)	TOCRIS #4192	1 μ l (final:1 μ M)
Human LIF (stock:10 μ g/ml)	Peprotech #300-05-1mg	10 μ l (final:10ng/ml)
Go6983 (stock:5mM)	TOCRIS #2285	4 μ l (final:2 μ M)
XAV939 (stock:20mM)	Selleck S1180	1 μ l (final:2 μ M)

Wash buffer

DMEM/F12	nacalai #11581-15	500ml
7.5% BSA	Wako #012-23881	6.76ml (final: 0.1%)

TrypLE+CDS

TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red	5mL
cell dissociation solution (#S-004-C)	5mL

Accutase+EDTA

Accutase	5mL
5.0 μ mol/l-EDTA 溶液	5mL

[0141] 実施例2：ナীব型多能性幹細胞から分化誘導効率の高いプライム型多能性幹細胞への誘導

ヒトプライム型多能性幹細胞ライン (H9ES細胞、585B1iPS細胞、1231A3iPS

細胞、1383D6iPS細胞、585B1iPS細胞、201B7iPS細胞、409B2iPS細胞、I14S04 iPS細胞由来) からナイーブ型多能性幹細胞を経てプライム型多能性幹細胞 (以下、「リプライム型多能性幹細胞」とも称する。) を誘導した (代表的な細胞形態を図10に示す) (培養スケール: 6well plate)。具体的には、以下の方法でリプライム型多能性幹細胞を誘導した。

[0142] iMatrix-511(MATRIXOME社)を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるようにコーティングし、ナイーブ型多能性幹細胞の剥離方法 (実施例 1 の2nd Passage以降の継代方法で述べた細胞剥離方法と同様の方法) を用いてシングルセル化したナイーブ型多能性幹細胞を6well plate に 1×10^5 個/well 播種し、StemFit AK02(AJINOMOTO HEALTHY SUPPLY CO)+Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)培地にて培養を 37°C 、 $5\%\text{O}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ で培養開始した。播種から2日後からはY-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)を含まない培地に交換した。細胞がコンフルエントになるまで毎日StemFit(AK02)培地にて培地交換を行った。上述方法によれば、ナイーブ型多能性幹細胞から、約8日程度でプライム型多能性幹細胞が誘導される。H9および585B1 iPS細胞の形態を示す(図10)。

[0143] リプライム型多能性幹細胞のFlow Cytometers(FCM)解析を以下の方法にて実施した。PBSで培養中のnaive iPS細胞を2回洗浄した。洗浄液を除去し、Accutase にて細胞を剥離し、15mL tubeに分注しておいたwash buffer中に回収した。遠心後、Hanks buffer+Y27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$) 1mLで再懸濁し、トリプンブルーでセルカウントを実施した。FCM解析に必要なリプライム型多能性幹細胞の細胞数を1.5mLチューブに分注し、Hanks buffer + Y27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$) $50 \mu\text{L}$ にて氷上で20から30分ブロッキングを実施した。次に、Hanks buffer + Y27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$) に解析に必要な抗体 (CD24、CD57、SUSD2、CD320) を添加し、氷上で20から30分抗原抗体反応を実施した。細胞を洗浄後、Hanks buffer + Y27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)で懸濁し、DAPIを加え細胞を懸濁しFCM解析を実施した。

[0144] プライム型多能性幹細胞からナイーブ型を経て、リプライム型多能性幹細胞を誘導したときに表面抗原の推移を図11に示す。ナイーブ型多能性幹細胞

を上記方法でリプライム型多能性幹細胞に誘導を開始して9日目以降ではナイーブ型多能性幹細胞のマーカであるSUSD2、CD320を消失し、プライム型多能性幹細胞のマーカであるCD24とCD90を発現することが明らかとなった(図11)。

[0145] 本実施例で用いた試薬は以下の表3の通りである。培養容器のコーティング剤は、iMatrix511だけでなく、ラミニン、ビトロネクチン、ファイブロネクチン、マトリゲル、geltrexなど一般的にプライム型多能性幹細胞が培養できるとされているものであれば使用できる。MEF上で培養することも可能である。本実施例では、細胞剥離液として、TrypLE(Thermo Fisher)と cell dissociation solutionを等量混和したものを使用しているが、一般的なプライム型多能性幹細胞で使用されているAccutase、TrypLEなどでもよい。プライム型iPS細胞を培養する培養液は、StemFit AK02やmTeSR1、Essential 8 培地 (Gibco) など一般的なプライム型多能性幹細胞を培養可能な培養液であれば使用できる。播種細胞数については、4日程度でコンフルエントに到達しないのであれば1x10⁴個~1x10⁵個/wellでもよく、株での細胞増殖速度による。

[0146] [表3]

TrypLE+CDS	
TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red	5mL
cell dissociation solution (S-004-C)	5mL

[0147] 実施例3：リプライム型多能性幹細胞の分化能の検証

次に、プライム型多能性幹細胞と、リプライム型多能性幹細胞における分化能について評価した。概要を図12に示す。

[0148] 1. 神経細胞および心筋細胞の誘導

神経細胞および心筋細胞への分化能を検証した。神経誘導に関しては100 nM LDN-193189および10 μM SB431542をNdiF227培地に加えて、10日間培養後、PAX6-FITCの発現をフローサイトメトリーで定量した。心筋誘導に関しては

、PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit(ThermoFisher、製品番号A2921201)を用いて誘導した。10日目に拍動する心筋のウェル数をカウントした。

[0149] 結果を図13に示す。プライム型では、神経細胞および心筋細胞への分化能力が低い株が、実施例2の方法によりリプライム型にすることによって、神経細胞または心筋細胞への分化能力が向上することが示された(図13)。

[0150] 2. ヒト始原生殖細胞様細胞(human primordial germ cell like cell; hPGCLC)の誘導

PGCLCへの分化能を検証した。ヒトプライム型多能性幹細胞ライン(H9ES細胞、H1ES細胞、585B2iPS、201B7iPS、409B2iPS細胞等由来)を使用した。実施例2の一過性ナイーブ型誘導を一過性に誘導しプライム型にしたiPS細胞(即ち、リプライム型iPS細胞)を用いた。プライム型iPS細胞 $2.5\text{--}3.5 \times 10^3$ cellsを150 μL のhPGCLC分化誘導培地にて懸濁し、low-cell-binding V-bottom 96 well plates (MS-9096V; Sumitomo Bakelite)に1wellに播種した。hPGCLC分化誘導培地として、15% [v/v] KSR (10828028; Gibco)、0.1 mM NEAA (11140-050; Gibco)、2 mM L-glutamine (25030-081; Gibco)、1 mM sodium pyruvate (11360-070; Gibco)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (M3148; Sigma-Aldrich)、10 ng/mL LIF (300-05; Peprotech)、200 ng/mL BMP4 (314-BP; R&D systems)、100 ng/mL SCF (300-07; Peprotech)、50 ng/mL EGF (236-EG; R&D systems)および10 μM Y-27632 (10005583; Cayman)を含むGlasgow's MEM (11710-035; Gibco)を用いた。播種後培地交換はせずに、5日間培養した。

[0151] 培養後のhPGCLC分化誘導効率の評価については、次の抗体陽性細胞を指標とした。hPGCLCAPC anti-human CD326 (EpCAM) Antibody (Biolegend, Cat#324208) Brilliant Violet 421™ anti-human/mouse CD49f (ITGA6) Antibody (Biolegend, Cat#313623)。

[0152] 結果を図14に示す。プライム型では、hPGCLCへは分化しない、あるいはhPGCLCへの分化能力が低い株が、実施例2の方法によりリプライム型にすることによって、hPGCLC (CD326+CD49f+細胞) への分化能力が向上することが示された。

[0153] 3. 神経堤細胞の誘導

神経堤細胞への分化能を検証した。1383D6株のプライム型細胞とリプライム型細胞を、iMatrix（ラミニン-511 E8フラグメント）でコーティングされた培養皿およびStemfit AK03Nゼノフリー（化学的に明確かつ動物成分不含）培地（Sci Rep 4, 3594（2014））で維持した。神経堤細胞誘導を開始する前に、コロニーが形成されるまで該細胞株を4日間培養した。10 μ MのSB431542および1 μ MのCHIR99021（CHIR）を添加したStemfit Basic03培地で神経堤細胞を誘導してから10日後に、神経堤細胞の細胞表面マーカーであるCD271抗体を用いた蛍光活性化セルソーティング（FACS）を使用して、誘導効率を分析した。

[0154] 結果を図15に示す。実施例2の方法により作製したリプライム型多能性幹細胞から分化誘導させた細胞集団は、プライム型多能性幹細胞から分化誘導させた細胞集団よりも、神経堤細胞のマーカーであるCD271を高発現する細胞（CD271強陽性細胞）の割合が高いことが示された。図15のヒストグラムのうち、プライム型で主に観察される、 $10^3 \sim 3 \times 10^4$ くらいの範囲で観察される山は、神経堤細胞以外の細胞であり、CD271弱陽性細胞（CD271^{dim}細胞）とも呼ばれる。また、リプライム型で観察される、 $10^4 \sim 10^5$ くらいの範囲で観察される山が神経堤細胞であり、CD271強陽性細胞（CD271^{high}細胞）とも呼ばれる。プライム型多能性幹細胞からはCD271強陽性細胞（神経堤細胞）はほとんど生じなかったのに対し、リプライム型多能性幹細胞からは非常に多くのCD271強陽性細胞（神経堤細胞）が生じたことから、リプライム型にすることによって、神経堤細胞への分化能力が大幅に向上することが示された。

[0155] 4. 血液細胞の誘導

4-1. 血小板の誘導

血小板への分化能を検証した。W02012/157586、US2014/127815、Nakamura, Eto, et al. Cell Stem Cell 14, 535-548（2014）、Sone, Nakamura, Eto, et al. Stem Cell Reports, 16(12):2861-2870（2021）記載の方法を用いて、プライム型多能性幹細胞由来巨核球株（imMKCL）及びプライム型多能性幹細胞か

らナイーブ型多能性幹細胞へ誘導後に再度プライム型多能性幹細胞(リプライム型)に誘導した細胞由来imMKCLをIto, Nakamura, Eto et al. Cell, 174(3):636-648(2018)に記載の成熟培養液で6日間培養後、培養液を回収した。回収した培養液をCD41a、CD42b抗体で標識し、BD Trucount™を用いてフローサイトメトリーでCD41a、CD42b両陽性の血小板をカウントした。

[0156] 結果を図16に示す。実施例2の方法により作製したリプライム型iPS細胞から分化誘導させた場合に、プライム型iPS細胞から分化誘導させた場合よりも、血小板への分化能力が向上することが示された。

[0157] 4-2. T細胞の誘導

次に、T細胞への分化能を検証した。iPS細胞からCD8陽性T細胞への分化誘導プロトコールは以下のように行った。まず、WNT、BMP、bFGFおよびVEGF、SCFを培地に添加し、胚様体(EB)を作製した。2週間後、CD34陽性細胞を取り出し、その後、約20日間、SCF、TP0、FLT3L、IL-7等を用いることでCD4CD8 double positive(DP)細胞を誘導した(Iriguchi S et al., Nature Communications, 2021 Jan 18;12(1):430.)。続いて約1週間OKT3、IL-7、IL21等を用いることでCD8 single positive(D8 SP)細胞を誘導し、成熟化を促した(Kawai Y et al., Mol Ther, 2021 Oct 6;29(10):3027-3041)。またPHA、IL-7、IL-15を用いることで維持を行った。

[0158] 結果を図17-19に示す。T細胞への誘導においても、プライム型では分化能力が低いiPS細胞株が、実施例2の方法によりリプライム型にすることにより、T細胞への分化能力が向上することが示された。リプライム型は、より効果的に、CD4+/8b+、CD5+/CD28+、CD1+/CD28+陽性細胞を誘導できた(図17)。また、CD5+/CD28+ CD8+ SP細胞への分化能力が向上した(図18)。CD8陽性細胞を維持、拡大培養することも可能であった(図19)。

[0159] 4-3. 大脳皮質オルガノイドの誘導

大脳皮質オルガノイド分化誘導においても、プライム型では分化能力が低いiPS細胞株が、実施例2の方法によりリプライム型にすることにより、大脳皮質オルガノイドへの分化能力が向上することが示された。誘導方法の概要

図を示す（図20）。培養と評価方法の詳細を下記に記す。

[0160] <iPS細胞の維持培養>

iMatrixコートした6ウェルプレート上でStemFit AK02N培地で培養した。分化誘導前日（d-1）にAK02N-bFGF培地（bFGFを除いたAK02N培地）にSB431542を5 μ Mで添加し培養した。分化誘導初日（d0）酵素で分散した未分化iPS細胞を96ウェルプレートに9,000 cells/wellで播種した。DMEM/F12培地に20%KS R、3 μ M IWR-1e、5 μ M SB431542を添加した培地で培養し、3日に1度培地交換した。分化誘導初日のみ、50 μ MのY-27632を添加した。分化誘導18日目に96ウェルプレートから90-mmディッシュにオルガノイドを移し、DMEM/F12に1 $\times$ N2 supplement、Chemically Defined Lipid Concentrate (CDLC)を添加した培地で培養した。以降は50rpmで巡回培養を行い、3-4日に1度培地交換した。35日目に実体顕微鏡でオルガノイドを撮影し、ロゼット構造を含むオルガノイドの形成効率を算出した。ナীব型多能性幹細胞を経たりプライム型においてはFOXG1/CTIP2/PAX6/DAPI陽性の形態の整った大脳皮質オルガノイドが形成された（図21）。また、ロゼット含有オルガノイドの割合（% of rosette-containing organoids）も上昇した（図22）。

[0161] 実施例4：プライム型多能性幹細胞を経ることなく誘導したナীব型から誘導したプライム型多能性幹細胞の分化能の検証

ヒト体細胞（HDF細胞とhADSC細胞）を使用した。HDF細胞（Human Dermal Fibroblasts）は、成人ヒト皮膚に由来する線維芽細胞であり、本実施例では、市販の細胞（Thermo Fisher Scientific、C0135C）を用いた。また、hADSC細胞（Human Adipose-derived stem cell）は、ヒト脂肪吸引組織に由来する間葉系幹細胞であり、本実施例では、市販の細胞（Thermo Fisher Scientific、R7788115）を用いた。

[0162] <維持培養>

培養細胞を2回PBSで洗浄しトリプシンを0.5mL添加し37°C、CO₂で5分インキュベートした。HDF培地（DMEM High Glucose 500mL、FBS(10%) 55mL、2ME ; HDFおよびhADSCともに共通）を3mL添加し細胞を回収後1300rpm、3分遠心し細

胞回収した。細胞をHDF培地で1-3継代した。

[0163] <体細胞からのナীব型細胞の誘導>

維持培養している細胞の表面を洗浄し、2回PBSで洗浄しトリプシンを0.5mL添加し37℃、CO₂で5分インキュベートした。HDF培地（DMEM High Glucose 500mL、FBS(10%) 55mL、2ME）を3mL添加し細胞を回収後1300rpm、3分遠心し細胞回収した。24well plateに5x10³ cells/well播種した。

[0164] <トランスフェクション>

翌日（Day1）細胞をPBSで2回洗浄した。培地をAK02培地と交換した。Day1～4までトランスフェクションを実施するためmRNAとmiRNAを準備した。含まれている因子を表5に示す。表5中、miRNA Mimicは全て市販のものを用いた（mirVana™ miRNA Mimic（Thermo Fisher））。初期化因子をmRNA分子の形態で細胞に導入する方法を、mRNA法とも称する。表4に従って試薬を混和した。試薬の混和に代えて、市販のキット（例えば、StemRNA-3rd Gen Reprogramming Kit（Reprocell；00-0076）など）を用いてもよいが、該キットはmiRNA Mimic hsa-miR-98-5pを含んでいないので、該miRNA Mimicを別途追加することが好ましい。5分室温でインキュベートした。AとBをタッピングで混和して15分室温で反応させた。各ウェルに試薬を添加し、一晚培養した。翌日前述のトランスフェクションをDay4まで繰り返した。Day5からcRM2+Y-27632で維持培養した。Day7-9位において、naive様の細胞が出現した（図23）。以降の培養については実施例1のnaive iPS細胞のフィーダーフリー培養の1st passage以降の操作と同じであった。

なお、データは割愛するが、表5に示すRNAカクテルからhsa-miR-98-5pを除去したカクテルを用いて体細胞からナীব型多能性幹細胞を誘導した場合でも、Day7-9位においてnaive様の細胞は出現する。しかし、hsa-miR-98-5pを利用することで顕著に（3～10倍程度）ナীব型細胞の誘導効果が上昇する。

[0165] （オプション）

Day5において、cRM2+Y-27632に表5のmiRNA Mimic hsa-miR-98-5pを追加し

ても良い。表 6（98-5pの調製）にあるように試薬を調整し、培養液に滴下した。一晚培養し、翌日cRM2培地+Y-27632（最終濃度10μM）で培地交換を実施した。この結果、より効果的にナイーブ様のドーム状の細胞塊を誘導できた（図24左）。

[0166] [表4]

24 ウェルプレートトランスフェクション

(A)	1well 分/day
RNA カクテル	3.35 μL (100ng/μL)
OptiMEM	46.65 μL
total	50 μL
(B)	1 well 分(μL)
Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher Scientific 13778075)	1.2 μL
OptiMEM	48.8 μL
total	50 μL

[0167] [表5]

RNA カクテル

OCT4 mRNA	SOX2 mRNA	KLF4 mRNA	MYCL mRNA	NANOG mRNA	LIN28A mRNA
E3L mRNA	K3L mRNA	B18 mRNA			
miRNA Mimic hsa-miR-302a-3p	miRNA Mimic hsa-miR-302b-3p	miRNA Mimic hsa-miR-302c-3p	miRNA Mimic hsa-miR-302d-3p	miRNA Mimic hsa-miR-367-3p	miRNA Mimic hsa-miR-98-5p (98-5p miRNA)

[0168]

[表6]

98-5p miRNA の調製

RNA 溶液の調製	μ L
10 μ M mimic nega/98-5p	0.16
OptiMEM	59.84
total	60

Lipofectamine 溶液の調製	μ L
RNAiMAX	3
OptiMEM	57
total	60

[0169] 体細胞から直接、ナীব型多能性幹細胞を誘導し、実施例2に記載の方法によりその後プライム型多能性幹細胞へ誘導した（図25右、「プライム型多能性幹細胞」）。ナীব型多能性幹細胞を経たプライム型多能性幹細胞は、前記体細胞から誘導された、ナীব型多能性幹細胞を経由していないプライム型多能性幹細胞（図25左）よりも、実施例3に記載の方法によりPGCLC（CD326+CD49f+細胞）へ高効率に分化した（図25）。

[0170] 以上より、リプライム型多能性幹細胞または直接誘導型ナীব型多能性幹細胞由来のプライム型多能性幹細胞は、いずれも分化抵抗性が低いことが示された。

[0171] 実施例5：体細胞から、プライム型多能性幹細胞を経由したナীব型多能性幹細胞（リセット細胞）への誘導

実施例1では、プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞を誘導した。そこで、体細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導し、さらにナীব型多能性幹細胞を誘導した例を示す。

体細胞として、ヒト末梢血単核細胞（PBMC、LONZA、CC-2704）を使用した。PBMCは、前培養培地（100ng/mL SCF (STEMCELL Technologies)、100ng/mL T

P0、100ng/mL Flt3、50ng/mL IL-6、50ng/mL IL-3、いずれもFUJIFILM社製）を含むStemSpan™-ACF Erythroid Expansion Medium (STEMCELL Technologies, ST-09860) 中で6日間培養してから表5のRNAカクテルを用いたmRNA法にてプライム型多能性幹細胞へと誘導した。その後、実施例1の方法（Feeder Free条件下でのナীব型多能性幹細胞誘導）に従って、ナীব型多能性幹細胞への誘導を行った（Day0）。19日後（Day19）までの位相差顕微鏡イメージを図26に示す。Day13には典型的なナীব型多能性幹細胞コロニーが多数観察された。

よって、PBMCからmRNA法でプライム型多能性幹細胞を誘導し、その後ケミカルリセット法でナীব型多能性幹細胞が問題なく製造されることが示された。

[0172] 実施例6：直接誘導型ナীব型多能性幹細胞由来プライム型多能性幹細胞の製造方法のバリエーション

実施例4では、体細胞から直接プライム型多能性幹細胞を製造するよりも、一旦ナীব型多能性幹細胞へと誘導し、その後プライム型多能性幹細胞へと誘導した方が、体細胞から直接誘導されたプライム型多能性幹細胞よりも分化抵抗性が劇的に減少したプライム型多能性幹細胞が製造できることを示した。この効果が実施例4の実施態様に限定されないことが、下記の点について確認された。

[0173] 1. let-7-5p miRNA family内のバリエーション

体細胞から直接ナীব型多能性幹細胞を誘導する工程において、miR-98-5pだけでなく、let-7-5p miRNA familyに属する他のmiRNAを用いても、同様にナীব型多能性幹細胞が誘導されることが確認された。

[0174] 由来の異なるHFD株3種類（新生児由来1種、成人由来2種）に対し、表5におけるhas-miR-98-5pをhas-let-7a-5pまたはhas-let-7b-5pのmiRNA mimic（いずれもThermo Fisher社のmirVana™ miRNA Mimic）に変えて、その他の条件は実施例4に従い、ナীব型多能性幹細胞へと誘導した。成人由来HFD：Adult HDF1 (Promocell, C-12302)、Adult HDF2 (Thermo Fisher Scientific)

fic、R7788115)のうち、Adult HDF2は実施例4で使用した細胞株である。いずれの細胞株からも、let-7a-5pまたはlet-7b-5pの使用により、miR-98-5pを使用した場合と同様に、典型的なナীব型多能性幹細胞コロニーが同程度観察された(図27左イメージ)。qPCR法で代表的な多能性幹細胞マーカー遺伝子(OCT3/4、KLF4、NANOG)の発現を解析したところ、let-7a-5p、let-7b-5pのいずれを用いて誘導した細胞においても、miR-98-5pを用いて誘導した細胞と同様に、3種類すべてのマーカー遺伝子を同程度発現していることが確認された(図27右グラフ)。

よって、miR-98-5pだけでなく、let-7-5p miRNA familyに属する他のmiRNAにも、体細胞からナীব型多能性幹細胞への誘導を促進する効果があることが示された。

[0175] 2. 体細胞のバリエーション

HDF細胞とhADSC細胞だけでなく、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC; Human Umbilical Vein Endothelial Cells)からも、実施例4の方法でナীব型多能性幹細胞が誘導できることを確認した。

[0176] HUVEC(タカラバイオ社、C-12200)は、内皮細胞増殖培地(Endothelial Cell Growth Medium 2: EGM2培地、TAKARA, C-22111)を用いて、コラーゲンIでコートした細胞培養用プレート上で維持培養を行った後に、実施例4のトランスフェクションを行った。Day0~Day2まではEGM2培地を使用し、Day3~Day5はAK03培地を使用した。Day14の位相差顕微鏡イメージを図28左上パネルに示す。典型的なナীব型多能性幹細胞コロニーが多数観察された。

続いて、実施例2の方法に従って、プライム型多能性幹細胞への誘導を行った。プライム型への誘導開始から14日後の位相差顕微鏡イメージを図28右上パネルに示す。多数のコロニーが観察され、そのすべてが典型的なプライム型多能性幹細胞コロニーであった。

よって、HUVECからも、実施例4の方法でナীব型多能性幹細胞が製造され、該細胞から問題なくプライム型多能性幹細胞が製造されることが示された。

[0177] さらに、骨形成タンパク質の効果も解析した。

実施例4の方法に従ってHUVECに表5のRNAカクテルを導入してから6日後（Day6）に培地に10ng/mLのBMP4（R&D, 314-BP-500, Recombinant human BMP4 Protein）を添加し、Day7までBMP4含有培地で培養した。その結果、Day14には、BMP4を追加しなかった細胞群よりも多くのナীব型多能性幹細胞コロニーが得られた（データ非開示）。

[0178] また、表5のRNAカクテルからhas-miR-98-5p miRNA mimicのみを除去したカクテルを使用し、Day6から培地に10ng/mLのBMP4を添加しDay7までBMP4で培養する実験も行った。図28の下段に結果を示す。上段のRNAカクテル（miR-98-5p含有）を使用した結果と比べると、ナীব型多能性幹細胞コロニーの数はかなり減少したが（下段左）、該細胞から問題なくプライム型多能性幹細胞が誘導されることが確認された（下段右）。

[0179] よって、（let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAには及ばないが）骨形成タンパク質にも体細胞からナীব型多能性幹細胞への誘導を促進する効果があり、骨形成タンパク質とlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを併用することで当該促進効果が一層高まることが明らかになった。

[0180] 3. 初期化因子等の導入方法のバリエーション

実施例4では、初期化因子を発現ベクターにコードした形態で細胞に導入するのではなく、mRNA分子として細胞に導入する方法（すなわち、mRNA法）を採用して、体細胞からナীব型多能性幹細胞を誘導した。そこで、mRNA法に限らず、発現ベクターを用いる方法、特に、再生医療の観点から好適なセンダイウイルスベクターを用いてナীব型多能性幹細胞を誘導した場合にも、分化抵抗性が格段に改善されたプライム型多能性幹細胞が製造できることを確認した。さらに、ナীব型多能性幹細胞に誘導後、CD320強陽性細胞のみを選別してプライム型多能性幹細胞に誘導すると、分化抵抗性がより一層改善されたプライム型多能性幹細胞が製造できることも確認された。

[0181] センダイウイルス（SeV）ベクターを用いたリプログラミングは、CytoTune（登録商標）-iPS 2.0L（ID Pharma）を用いて行った。このキットに含まれ

るセンダイウイルスベクターは、初期化因子としてOct3/4、Sox2、KLF4、L-MYCをコードしている（なお、let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAはコードされていない）。

PBMC (LONZA, CC-2704) を実施例5に記載の前培養培地で5日間培養した後、iMatrix-511 silkでコートした24well plateに 1×10^5 cells/wellの細胞密度で播種した。翌日 (Day0)、CytoTune (登録商標) -iPS 2.0L (ID Pharma) のマニュアルに従い、PBMCにセンダイウイルスベクターを接触させた。Day2に培地をAK03に置換し、Day6にcRM2培地に置換し、以降は実施例1の手法に従って培養してナীব型多能性幹細胞を誘導した (図29下段左)。得られたナীব型多能性幹細胞の一部に対し、実施例2の手法に従って、プライム型多能性幹細胞を誘導した (図29下段右)。残りのナীব型多能性幹細胞は、実施例1の「4. 原始内胚葉への分化能およびmiRNA発現の検証 (図7D)」と同じ手法でフローサイトメトリー法に供し、CD320強陽性細胞の分画を得た (図30のCD320⁺ cells)。フローサイトメトリーに供する前の細胞は非選別分画 (図30のBulk) とした。

一方で、Day2に培地をAK03に置換し以降AK03培地で培養することで、プライム型多能性幹細胞を誘導した (図29上)。

[0182] 前記CD320強陽性細胞分画と非選別分画に対し、実施例2に従ってプライム型多能性幹細胞へと誘導し、その後、実施例3の「2. ヒト始原生殖細胞様細胞(human primordial germ cell like cell; hPGCLC)の誘導」と同じ手法で始原生殖細胞へと分化誘導した (図30)。始原生殖細胞への分化効率をフローサイトメトリー法で解析し (図31左)、グラフ化した (図31右)。非選別のナীব型多能性幹細胞に由来するプライム型多能性幹細胞では、始原生殖細胞様細胞に分化した細胞の割合が約8.68%であったのに対し、CD320強陽性のナীব型多能性幹細胞に由来するプライム型多能性幹細胞では、当該割合が18%という高値であった。なお、結果は割愛するが、PBMCから (ナীব型を経ずに) 直接誘導されたプライム型多能性幹細胞では、始原生殖細胞に分化した細胞は観察されなかった。

[0183] 前記CD320強陽性細胞分画と非選別分画に対し、始原生殖細胞への分化誘導開始時におけるセンダイウイルスベクターの残存量を定法に従って解析した（図29D）。SeV法で製造したiPSCでは、通常、細胞内に導入されたセンダイウイルスベクターが十分に希釈されるよう、十分な継代培養を行ってから分化誘導に用いる。残存するセンダイウイルスベクターから発現し得る初期化因子の影響を極力排除するためである。

図29Dに示されるように、リプログラミング開始から1日後（Day1）の細胞では非常に多くのセンダイウイルスベクターが検出されたが（Repro. Day 1）、プライム型iPSCに誘導後10継代を経た細胞ではほぼ検出されなかった（*primed iPSC (passage 10th））。これに対し、CD320強陽性細胞分画と非選別分画ではいずれも、相当量のセンダイウイルスベクターが検出された（Donor 1, 2のBulkとCD320+）。

よって、体細胞からナীব型多能性幹細胞を誘導し、該細胞をプライム型多能性幹細胞に誘導して得られる多能性幹細胞（直接誘導型ナীব型多能性幹細胞由来プライム型多能性幹細胞）は、センダイウイルスベクター（初期化因子）が相当量残存していても、高い分化能を示すことが明らかになった（また、この結果より、さらに継代培養を経て初期化因子が十分に希釈された状態では、より一層優れた分化能を示すことも示唆された）。

[0184] よって、実施例1の「4. 原始内胚葉への分化能およびmiRNA発現の検証（図7）」の結果と併せると、体細胞、プライム型多能性幹細胞のいずれから誘導されたナীব型多能性幹細胞かに拘わらず、CD320の発現量の高い細胞を選別することで、分化抵抗性が非常に改善されたプライム型多能性幹細胞が得られることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0185] 本発明により、分化能力に優れた多能性幹細胞を製造することができる。また、分化能力の低い多能性幹細胞であっても、分化能力を向上させることが可能となるため、現存の多能性幹細胞、特にiPS細胞の分化能力について、株間の差が小さくなり、様々な細胞への分化誘導が容易になる。このように

分化誘導した細胞は、免疫療法、再生医療および創薬スクリーニングなどに有用である。

[0186] 本出願は、日本で出願された特願2023-032539（出願日：2023年3月3日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] プライム型多能性幹細胞を製造する方法であって、
（１）霊長類動物のナীব型多能性幹細胞を準備する工程、および
（２）前記工程（１）で準備したナীব型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程
を含む、方法。
- [請求項2] 工程（２）で得られたプライム型多能性幹細胞を回収する工程を含む、請求項１に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程（１）が、霊長類動物のプライム型多能性幹細胞を培養してナীব型多能性幹細胞を製造する工程である、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項4] 前記培養が１４日間以上行われる、請求項３に記載の方法。
- [請求項5] 細胞集団からCD320陽性細胞を選別する工程を含む、請求項３または４に記載の方法。
- [請求項6] 前記工程（１）が、体細胞からプライム型多能性幹細胞を経ることなくナীব型多能性幹細胞を製造する工程である、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項7] 体細胞に初期化因子およびlet-7-5p miRNA familyに属するmiRNAを導入する工程を含む、請求項６に記載の方法。
- [請求項8] let-7-5p miRNA familyに属するmiRNAが、miR-98-5p、let-7a-5p、let-7b-5p、let-7c-5p、let-7e-5p、let-7f-5p、let-7g-5pおよびlet-7i-5pからなる群から選択される少なくとも１種のmiRNAである、請求項７に記載の方法。
- [請求項9] 細胞に骨形成タンパク質を導入する工程を含む、請求項６～８のいずれか１項に記載の方法。
- [請求項10] 細胞内の骨形成タンパク質を活性化する工程を含む、請求項６～９のいずれか１項に記載の方法。

- [請求項11] 初期化因子を有するウイルスベクターを体細胞に導入する工程を含む、請求項6～10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項12] 前記工程（2）が、工程（1）で準備されたナイーブ型多能性幹細胞を、bFGFを含む培地中で4日間以上培養する工程を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項13] 前記工程（2）が、フィーダーフリー条件下での培養である、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項14] 全培養期間がフィーダーフリーかつゼノフリー条件下である、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項15] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項16] 請求項1～15のいずれか1項に記載の方法により得られたプライム型多能性幹細胞。
- [請求項17] 請求項16に記載のプライム型多能性幹細胞を分化誘導させる工程を含む、細胞またはオルガノイドの製造方法。
- [請求項18] 前記細胞が、神経堤細胞、神経前駆細胞、神経細胞、造血前駆細胞、血小板、T細胞、エピブラスト様細胞、始原生殖細胞および心筋細胞からなる群から選択される、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記オルガノイドが脳皮質オルガノイドである、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 多能性幹細胞の分化能力を向上させる方法であって、
（1）霊長類動物のプライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞を誘導する工程、および
（2）前記工程（1）で誘導したナイーブ型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞を誘導する工程を含む、方法。