

明 細 書

発明の名称： インビトロで多能性幹細胞を分化誘導する方法

技術分野

[0001] 本発明は、インビトロで多能性幹細胞を分化誘導する方法に関する。より具体的には、本発明は、多能性幹細胞又は該多能性幹細胞が濃縮された細胞画分を、情報提示細胞由来の傷害細胞及び／又は死細胞（それらの一部を含む）と共培養することを含む、インビトロで多能性幹細胞を情報提示細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞に分化誘導する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、多能性幹細胞から分化誘導する研究が進められ、分化誘導した種々の細胞は、再生医療、創薬研究、薬物安全性試験などの様々な用途への応用が期待されている。

[0003] 再生医療では、自家又は他家から採取された多能性幹細胞又はバンク保存された多能性幹細胞、あるいはこれらの多能性幹細胞から分化誘導した細胞を対象疾患に移植することにより、疾患を治療することが試みられている。また、創薬研究では、健常者由来の多能性幹細胞や患者から得られた疾患特異的な多能性幹細胞から分化誘導された目的とする細胞を解析やスクリーニングに利用し、該疾患に対する新薬を開発することが期待されている。さらに、薬物安全性試験では、開発中もしくは開発された医薬の毒性のスクリーニングに分化誘導された細胞を用いることが期待されている。

[0004] こうした用途に目的とした細胞を医療の現場で又は産業上利用され得るために、多能性幹細胞、多能性幹細胞から、大量に、安定して、かつ容易に分化誘導された細胞を得る必要がある。多能性幹細胞から目的とする種々の細胞を分化誘導する試みが報告されているが、分化誘導過程で特定の遺伝子を多能性幹細胞に導入する方法（特許文献1など）、各種サイトカインを添加した培地中で多能性幹細胞を分化させる方法（特許文献2）が知られている。しかしながら、こうした分化誘導法は、誘導手順が煩雑であり、また細胞

を誘導するために長期間（例えば、数週間）かかることから容易な手法とはいえず、さらにはコストも非常に嵩む。

[0005] その一方で、サイトカインを使わずに心筋細胞を分化誘導する方法も提案されている（非特許文献1）。この提案では、フィーダーレス培養後、単細胞に単離し、その後、高密度で播種し、接着培養を行っている。しかしながら、フィーダーレス培養に馴化することが可能な細胞でなければ分化させることが困難といった問題がある。

[0006] また、分化誘導の前提となる多能性幹細胞の1つとしては、本発明者らの一人である出澤氏によって見出された、間葉系細胞画分に存在するSSEA-3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) を表面抗原として発現しているMuse (Multilineage-differentiating Stress Enduring cells) が典型例として挙げられる（特許文献3；非特許文献2）。Muse細胞は、他の多能性幹細胞として知られる人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、神経幹／前駆細胞（NSPC）、臍帯血幹細胞（UCBC）とは異なり、細胞の調達が容易であり、iPS細胞のようにその調達のための遺伝子導入を必要とせず、腫瘍形成能を有しない。

[0007] Muse細胞の再生医療における貢献は、これまで多々知られ、心筋梗塞、脳腫瘍、脳梗塞、腎障害等の治療に見出すことができる（特許文献4など）。例えば、心筋梗塞の治療においては、Muse細胞を静脈から注入し、Muse細胞が梗塞部位に到達し、心筋細胞に分化することによって心筋梗塞の治療が達成されることが判明している。一方、静脈に投与されたMuse細胞が疾患部位に遊走するメカニズムも徐々に分かってきており、例えば、疾患部位から放出されていると考えられるSIP1などの遊走因子（傷害シグナル）が関与していることが示唆されている（特許文献5）。しかしながら、Muse細胞が、疾患部位の組織を構成する細胞に分化する詳細なメカニズムは解明されていない。

[0008] Muse細胞について言えば、この細胞を用いた疾患の治療は、傷害部位

から傷害シグナルを発する心筋梗塞などの急性疾患における場合のような細胞傷害とそれに伴う炎症反応が起こっているが傷害された細胞あるいはその一部がまだその場に残っている状態、すなわち「場の論理」が生きている間に、M u s e細胞の投与、遊走、及び分化という一連の流れにより治療を可能にする戦略であると言える。しかしながら、傷害シグナルの放出が低く「場の論理」がすでに消失している慢性疾患や血管を介した到達が困難な組織や臓器、又は希少細胞の再生には、上記のようなM u s e細胞の血管内投与によることのみでは達成されない場合が多い。そこで、インビトロにおいて、M u s e細胞などの多能性幹細胞から大量に、安定して、容易に、かつ低コストで分化誘導し、所望の細胞を得ることができれば、再生医療、創薬研究、薬物安全性試験などの様々な用途へのさらなる応用が可能になる。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特開2013-252081号公報
特許文献2：特開2004-298087号公報
特許文献3：国際公開第2011/007900号
特許文献4：国際公開第2014/027684号
特許文献5：国際公開第2014/133170号

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Yang L, et al., Nature, Vol. 453, p. 524-528 (2008)
非特許文献2：Wakao, S, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 108, p. 9875-9880 (2011)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 従来知られている多能性幹細胞を各種細胞に分化させる方法は、多段階の

分化誘導を経る必要があり、均一でかつ大量の所望の細胞を短期間で調製することは困難である。また、外来の遺伝子導入がされた i P S 細胞から分化した細胞では腫瘍化するといった可能性も否定できない。したがって、本発明は、均一で高機能の各種分化細胞を容易かつ効率よく調製する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、インビトロにおいて、M u s e 細胞が貪食性を有すること、及び傷害細胞又は死細胞（それらの一部を含む）を貪食することによりこれらの細胞に分化することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0013] すなわち、本発明は、以下の通りである。

〔１〕多能性幹細胞又は該多能性幹細胞が濃縮された細胞画分を、情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部と共培養することを含む、インビトロで多能性幹細胞を情報提示細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞に分化誘導する方法。

〔２〕多能性幹細胞が情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部を貪食することを特徴とする、上記〔１〕に記載の方法。

〔３〕前記多能性幹細胞が、生体の間葉系組織又は培養間葉系細胞から分離された S S E A - 3 陽性細胞である、上記〔１〕又は〔２〕に記載の方法。

〔４〕前記多能性幹細胞が、C D 1 0 5 陽性である、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕前記多能性幹細胞が、C D 1 1 7 陰性及び C D 1 4 6 陰性である、上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕前記多能性幹細胞が、C D 1 1 7 陰性、C D 1 4 6 陰性、N G 2 陰性、C D 3 4 陰性、v W F 陰性、及び C D 2 7 1 陰性である、上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕前記多能性幹細胞が、C D 3 4 陰性、C D 1 1 7 陰性、C D 1 4 6 陰性、C D 2 7 1 陰性、N G 2 陰性、v W F 陰性、S o x 1 0 陰性、S n a

i 1 陰性、S l u g 陰性、T y r p 1 陰性、及びD c t 陰性である、上記 [1] ～ [6] のいずれかに記載の方法。

[8] 前記多能性幹細胞が、以下の性質の全てを有する多能性幹細胞である、上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の方法：

- (i) テロメラーゼ活性が低いか又は無い；
- (i i) 三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；
- (i i i) 腫瘍性増殖を示さない；及び
- (i v) セルフリニューアル能を持つ。

[9] 多能性幹細胞の数と情報提示細胞由来の傷害細胞又は死細胞の数の比が 1 : 1 0 , 0 0 0 ～ 1 0 , 0 0 0 : 1 である、上記 [1] ～ [8] のいずれかに記載の方法。

[1 0] 情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部が、アポトーシス誘導剤、代謝拮抗薬、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗生物質、有糸分裂阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、抗がん剤、熱、低温、酸、アルカリ、超音波、及びボルテックスなどによる物理的破碎からなる群から選択される薬剤の添加によって得られたものである、上記 [1] ～ [9] のいずれかに記載の方法。

[1 1] 情報提示細胞が、外胚葉由来細胞である、上記 [1] ～ [1 0] のいずれかに記載の方法。

[1 2] 外胚葉由来細胞が、神経細胞、グリア細胞、色素細胞、皮膚細胞、内耳細胞、網膜細胞、角膜細胞、及び毛根細胞からなる群から選択される、上記 [1 1] に記載の方法。

[1 3] 情報提示細胞が、中胚葉由来細胞である、上記 [1] ～ [1 0] のいずれかに記載の方法。

[1 4] 中胚葉由来細胞が、心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨細胞、軟骨細胞、生殖系細胞、及び造血系細胞からなる群から選択される、上記 [1 3] に記載の方法。

[1 5] 情報提示細胞が、内胚葉由来である、上記 [1] ～ [1 0] のい

ずれかに記載の方法。

[16] 内胚葉由来細胞が、膵 β 細胞、肝細胞、胆管細胞、呼吸器系上皮細胞、消化管上皮細胞、血管内皮細胞、腎構成細胞、膀胱上皮細胞、及び膵外分泌細胞からなる群から選択される、上記[15]に記載の方法。

[17] 情報提示細胞が、希少細胞である、上記[1]～[10]のいずれかに記載の方法。

[18] 前記希少細胞が、運動ニューロン、ドーパミン神経、介在ニューロン、グルタミン作動性ニューロン、脳下垂体細胞、甲状腺細胞、副腎皮質、副腎髄質、頸動脈の圧センサー細胞、心臓刺激伝達系、脈絡叢上皮細胞、膵- α 細胞、膵- δ 細胞、及び肺クララ細胞からなる群から選択される、上記[17]に記載の方法。

[19] インビトロにおいて細胞製剤中に含有される細胞が、生存する多能性幹細胞であることを確認するための方法であって、

(a) 細胞製剤中の細胞と、傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部とを共培養し；及び

(b) 該細胞製剤中の細胞が、傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部に由来する外胚葉系細胞、中胚葉系細胞、及び／又は内胚葉系細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞に分化した場合に、該細胞製剤中に多能性幹細胞が生存していると判断することを含む上記方法。

[20] 多能性幹細胞又は該多能性幹細胞が濃縮された細胞画分を、情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部と共培養することを含む、インビトロで多能性幹細胞から情報提示細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞を製造する方法。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、多能性幹細胞を情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部と共培養させることにより、傷害細胞又は死細胞が起源とする情報提示細胞を多能性幹細胞から容易に分化させて得ることが可能で

ある。こうして得られた分化細胞は、再生医療、創薬研究、薬物安全性試験などの様々な用途への応用が可能である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]正常マウス心筋細胞を用いた分化誘導について検証した結果を示す。図

1 A及びBは、それぞれ、M u s e細胞を正常マウス心筋細胞から得られた培養上清又はエキソソームを培養系に添加した場合の各種マーカーのm R N A発現を検出した結果である。図1 Cは、M u s e細胞に正常マウス心筋細胞を直接接触させた場合のm R N A発現を検討した結果である。図1 Dは、直接接触による培養3日後及び7日後に、G A T A - 4の発現の有無を免疫染色によって検討し、蛍光顕微鏡下で観察した結果である。

[図2]傷害マウス心筋細胞を用いた分化誘導について検証した結果を示す。M u s e細胞を傷害マウス心筋細胞から得られた培養上清又はエキソソームを培養系に添加した場合の各種マーカーのm R N A発現を検出した結果である（それぞれ、図2 A及び2 B）。

[図3]M u s e細胞の貪食性を検証した結果を示す。貪食性を検証するためにP K H 2 6 P C L（赤色）を用いた。

[図4]傷害心筋細胞に対するM u s e細胞の貪食性を示す。アポトーシスを起こしたG F Pマウス心筋細胞と共培養したM u s e細胞は、壊れた心筋細胞の一部（緑色）をM u s e細胞内（赤色）に取り込んでいる。

[図5]心筋細胞への分化誘導を示す。図3と同様に、アポトーシスを起こしたG F Pマウス心筋細胞と共培養したM u s e細胞が、心筋細胞に分化誘導される様子を各種心筋マーカーの発現について蛍光顕微鏡下で観察した結果を示す。

[図6]アネキシンVによる貪食阻害による分化誘導抑制の結果を示す。

[図7]骨格筋細胞への分化誘導を示す結果である。図7 Aは、M u s e細胞（緑色）が、骨格筋細胞のマーカーであるミオゲニン（赤色）を発現していることを示した蛍光顕微鏡による画像である。図7 Bは、M y o Dを指標として、M u s e細胞が骨格筋細胞に分化したことを示す。

[図8]神経前駆細胞への分化誘導を示す結果である。Neuro2Aを指標として、Muse細胞が神経細胞に分化したことを示す。

[図9] β 細胞への分化誘導を示す結果である。前駆細胞マーカー(Nkx2.2とNeuroD1)及び成熟 β 細胞マーカー(Islet1)を指標として、Muse細胞が β 細胞に分化したことを示す。

[図10]肝細胞への分化誘導を示す結果である。AFPを指標として、Muse細胞が肝細胞に分化したことを示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、インビトロで多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、多能性幹細胞を傷害細胞又は死細胞と共培養させることにより、傷害細胞又は死細胞の起源となる細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞を得る方法に関する。本発明を以下に説明する。

[0017] 本発明は、多能性幹細胞又は該多能性幹細胞が濃縮された細胞画分を、情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部と共培養することを含む、インビトロで多能性幹細胞を情報提示細胞に分化誘導する方法に関する。本発明によれば、多能性幹細胞は、共培養中の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部を貪食することにより、傷害細胞等が由来する元の情報提示細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞に分化することができる。多能性幹細胞、特にMuse細胞の貪食性については、これまでMuse細胞はフェライト（磁性体）を貪食することは知られているが（特開2016-028614）、Muse細胞が情報認識細胞として、情報提示細胞である傷害細胞等を貪食することによって分化することは知られていない。上記の通り、本発明は、Muse細胞が傷害細胞等を貪食することによって、傷害細胞等の起源となる元の情報提示細胞に分化することができることを初めて見出したことに基づいている。このような多能性幹細胞の貪食性を利用したインビトロでの分化誘導は、多能性幹細胞を傷害細胞等と単に共培養することで達成されるが、傷害細胞等を得る方法及び共培養する方法は、当業者が通常行っている手法に基づいて容易に行われるものであり得て、限定されない

。

[0018] 一態様では、本発明は、

- (a) 情報提示細胞を培養する工程；
 - (b) 上記培養系で情報提示細胞を傷害又は死滅させる工程；及び
 - (c) 多能性幹細胞を工程 (b) の培養系に添加し、培養する工程
- を含む、多能性幹細胞をインビトロで分化誘導する方法であってもよい。

[0019] また、別の態様では、本発明は、

- (a') 多能性幹細胞を培養する工程；及び
 - (b') 情報提示細胞を傷害又は死滅させて、傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部を得る工程；及び
 - (c') 工程 (a) の培養系に工程 (b) で得られた傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部を添加し、培養する工程
- を含む、多能性幹細胞インビトロで分化誘導であってもよい。

[0020] (1) 多能性幹細胞

本発明の分化誘導法に使用される多能性幹細胞は、典型的には、本発明者の一人である出澤氏が、ヒト生体内にその存在を見出し、「Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring) 細胞」と命名した細胞である。Muse細胞は、骨髓液、脂肪組織 (Ogura, F., et al., Stem Cells Dev., Nov 20, 2013 (Epub) (published on Jan 17, 2014)) や真皮結合組織等の皮膚組織から得ることができ、各臓器の結合組織にも散在する。また、この細胞は、多能性幹細胞と間葉系幹細胞の両方の性質を有する細胞であり、例えば、それぞれの細胞表面マーカーである「SSEA-3 (Stage-specific embryonic antigen-3)」と「CD105」のダブル陽性として同定される。したがって、Muse細胞又はMuse細胞を含む細胞集団は、例えば、これらの抗原マーカーを指標として生体組織から分離することができる。また、Muse細胞はストレス耐性であり、間葉系組織又は培

養間葉系細胞から種々のストレス刺激により濃縮することができる。本発明の分化誘導法には、ストレス刺激によりM u s e細胞が濃縮された細胞画分を用いることもできる。M u s e細胞の分離法、同定法、及び特徴などの詳細は、国際公開第W O 2 0 1 1 / 0 0 7 9 0 0号に開示されている。また、W a k a oら（2011、上述）によって報告されているように、骨髓、皮膚などから間葉系細胞を培養し、それをM u s e細胞の母集団として用いる場合、S S E A - 3陽性細胞の全てがC D 1 0 5陽性細胞であることが分かっている。したがって、本発明によれば、生体の間葉系組織又は培養間葉系幹細胞からM u s e細胞を分離する場合は、単にS S E A - 3を抗原マーカーとしてM u s e細胞を精製し、使用することができる。なお、本明細書においては、本発明の分化誘導法において使用され得る、S S E A - 3を抗原マーカーとして、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織から分離された多能性幹細胞（M u s e細胞）又はM u s e細胞を含む細胞集団を単に「S S E A - 3陽性細胞」と記載することがある。また、本明細書においては、「非M u s e細胞」とは、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織に含まれる細胞であって、「S S E A - 3陽性細胞」以外の細胞を指す。

[0021] 簡単には、M u s e細胞又はM u s e細胞を含む細胞集団は、細胞表面マーカーであるS S E A - 3に対する抗体を単独で用いて、又はS S E A - 3及びC D 1 0 5に対するそれぞれの抗体を両方用いて、生体組織（例えば、間葉系組織）から分離することができる。ここで、「生体」とは、哺乳動物の生体をいう。本発明において、生体には、受精卵や胞胚期より発生段階が前の胚は含まれないが、胎児や胞胚を含む胞胚期以降の発生段階の胚は含まれる。哺乳動物には、限定されないが、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、ヤギ、フェレット等が挙げられる。本発明の分化誘導法に使用されるM u s e細胞は、生体の組織から直接マーカーを用いて分離される点で、胚性幹細胞（E S細胞）やi P S細胞と明確に区別される。また、「間葉系組織」とは、骨、滑膜、脂肪、血液、骨髓、骨格筋、真皮、靱帯、腱

、歯髄、臍帯、臍帯血などの組織及び各種臓器に存在する組織をいう。例えば、M u s e細胞は、骨髄や皮膚、脂肪組織から得ることができる。例えば、生体の間葉系組織を採取し、この組織からM u s e細胞を分離し、利用することが好ましい。また、上記分離手段を用いて、線維芽細胞や骨髄間葉系幹細胞などの培養間葉系細胞からM u s e細胞を分離してもよい。本発明の分化誘導法においては、使用されるM u s e細胞は、レシピエントに対して自家であってもよく、又は他家であってもよい。

[0022] 上記のように、M u s e細胞又はM u s e細胞を含む細胞集団は、例えば、S S E A - 3陽性、及びS S E A - 3とC D 1 0 5の二重陽性を指標にして生体組織から分離することができるが、ヒト成人皮膚には、種々のタイプの幹細胞及び前駆細胞を含むことが知られている。しかしながら、M u s e細胞は、これらの細胞と同じではない。このような幹細胞及び前駆細胞には、皮膚由来前駆細胞（S K P）、神経堤幹細胞（N C S C）、メラノブラスト（M B）、血管周囲細胞（P C）、内皮前駆細胞（E P）、脂肪由来幹細胞（A D S C）が挙げられる。これらの細胞に固有のマーカーの「非発現」を指標として、M u s e細胞を分離することができる。より具体的には、M u s e細胞は、C D 3 4（E P及びA D S Cのマーカー）、C D 1 1 7（c - k i t）（M Bのマーカー）、C D 1 4 6（P C及びA D S Cのマーカー）、C D 2 7 1（N G F R）（N C S Cのマーカー）、N G 2（P Cのマーカー）、v W F因子（フォンビルブランド因子）（E Pのマーカー）、S o x 1 0（N C S Cのマーカー）、S n a i 1（S K Pのマーカー）、S l u g（S K Pのマーカー）、T y r p 1（M Bのマーカー）、及びD c t（M Bのマーカー）からなる群から選択される11個のマーカーのうち少なくとも1個、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又は11個のマーカーの非発現を指標に分離することができる。例えば、限定されないが、C D 1 1 7及びC D 1 4 6の非発現を指標に分離することができ、さらに、C D 1 1 7、C D 1 4 6、N G 2、C D 3 4、v W F及びC D 2 7 1の非発現を指標に分離することができ、さらに、上記の11個の

マーカーの非発現を指標に分離することができる。

[0023] また、本発明の分化誘導法に使用される上記特徴を有する Muse 細胞は、以下：

- (i) テロメラーゼ活性が低いか又は無い；
- (ii) 三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；
- (iii) 腫瘍性増殖を示さない；及び
- (iv) セルフリニューアル能を持つ

からなる群から選択される少なくとも1つの性質を有してもよい。本発明の一局面では、本発明の分化誘導法に使用される Muse 細胞は、上記性質を全て有する。ここで、上記 (i) について、「テロメラーゼ活性が低いか又は無い」とは、例えば、TRAPEZE XL telomerase detection kit (Millipore 社) を用いてテロメラーゼ活性を検出した場合に、低いか又は検出できないことをいう。テロメラーゼ活性が「低い」とは、例えば、体細胞であるヒト線維芽細胞と同程度のテロメラーゼ活性を有しているか、又は HeLa 細胞に比べて $1/5$ 以下、好ましくは $1/10$ 以下のテロメラーゼ活性を有していることをいう。上記 (ii) について、Muse 細胞は、in vitro 及び in vivo において、三胚葉（内胚葉系、中胚葉系、及び外胚葉系）に分化する能力を有し、例えば、in vitro で誘導培養することにより、肝細胞、神経細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨細胞、脂肪細胞等に分化し得る。また、in vivo で精巢に移植した場合にも三胚葉に分化する能力を示す場合がある。さらに、静注により生体に移植することで損傷を受けた臓器（心臓、皮膚、脊髄、肝、筋肉等）に遊走及び生着し、組織に応じた細胞に分化する能力を有する。上記 (iii) について、Muse 細胞は、浮遊培養では増殖速度約 1.3 日で増殖するが、浮遊培養では 1 細胞から増殖し、胚様体様細胞塊を作り 14 日間程度で増殖が止まる、という性質を有するが、これらの胚様体様細胞塊を接着培養に持っていくと、再び細胞増殖が開始され、細胞塊から増殖した細胞が広がっていく。さらに精巢に移植した場合、少なくとも

も半年間は癌化しないという性質を有する。また、上記 (i v) について、M u s e 細胞は、セルフリニューアル (自己複製) 能を有する。ここで、「セルフリニューアル」とは、1 個の M u s e 細胞から浮遊培養で培養することにより得られる胚様体様細胞塊に含まれる細胞から 3 胚葉性の細胞への分化が確認できると同時に、胚様体様細胞塊の細胞を再び 1 細胞で浮遊培養に持っていくことにより、次の世代の胚様体様細胞塊を形成させ、そこから再び 3 胚葉性の分化と浮遊培養での胚様体様細胞塊が確認できることをいう。セルフリニューアルは 1 回又は複数回のサイクルを繰り返せばよい。

[0024] また、本発明の分化誘導法に使用される M u s e 細胞を含む細胞画分は、生体の間葉系組織又は培養間葉系細胞に外的ストレス刺激を与え、ストレス耐性の細胞を回収することを含む方法によって得られる、以下の性質の少なくとも 1 つ、好ましくは全てを有する、S S E A - 3 陽性及び C D 1 0 5 陽性の多能性幹細胞が濃縮された細胞画分であってもよい。

- (i) S S E A - 3 陽性 ;
- (i i) C D 1 0 5 陽性 ;
- (i i i) テロメラゼ活性が低いか又は無い ;
- (i v) 三胚葉に分化する能力を持つ ;
- (v) 腫瘍性増殖を示さない ; 及び
- (v i) セルフリニューアル能を持つ。

[0025] 上記外的ストレスは、プロテアーゼ処理、低酸素濃度での培養、低リン酸条件下での培養、低血清濃度での培養、低栄養条件下での培養、熱ショックへの暴露下での培養、低温での培養、凍結処理、有害物質存在下での培養、活性酸素存在下での培養、機械的刺激下での培養、振とう処理下での培養、圧力処理下での培養又は物理的衝撃のいずれか又は複数の組み合わせであってもよい。例えば、上記プロテアーゼによる処理時間は、細胞に外的ストレスを与えるために合計 0. 5 ~ 3 6 時間行うことが好ましい。また、プロテアーゼ濃度は、培養容器に接着した細胞を剥がすとき、細胞塊を単一細胞にばらばらにするとき、又は組織から単一細胞を回収するときに用いられる濃度

であればよい。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ又はN末端スレオニンプロテアーゼであることが好ましい。さらに、前記プロテアーゼがトリプシン、コラゲナーゼ又はジスパーゼであることが好ましい。

[0026] (2) 情報提示細胞

本発明のインビトロ分化誘導法において使用される「情報提示細胞」とは、多能性幹細胞から最終的に分化した状態にある細胞と同じ表現型及び機能特性を有し、分化誘導される前の細胞であって、傷害細胞又は死細胞の起源となる細胞を意味する。本発明において使用される情報提示細胞は、多能性幹細胞から所望の分化細胞を得ることができれば、その起源はいずれであってもよい。例えば、細胞の起源は、その目的に応じ、様々な哺乳動物を起源としてよく、限定されないが、ヒト、チンパンジー、その他の霊長類、家畜動物、例えばイヌ、ネコ、畜産動物、例えばウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、実験用動物、例えばウサギ、ラット、マウス、モルモットなどに由来する。

[0027] (3) 傷害細胞及び死細胞

本発明によれば、多能性幹細胞を所望の細胞に分化させるために使用される傷害細胞又は死細胞は、上記の情報提示細胞を起源とすることができる。本明細書で使用するとき、用語「傷害細胞」とは、例えば、人為的ストレス又は環境的ストレスにより傷害を受けているために、一般に好適な培養条件によって培養した場合であっても、増殖は困難であるが、その細胞が有する代謝活性は、生細胞と比較すると低下しているが、死細胞と比較すると有意に活性を有する状態の細胞をいう。本明細書で使用するとき、用語「死細胞」とは、好適な培養条件によって培養した場合であっても増殖は不可能であって、代謝活性を示さない状態の細胞をいう。「死細胞」は、ネクローシスによる死細胞又はアポトーシスによる細胞死のいずれであってもよい。なお、本発明によれば、多能性幹細胞の貪食性は、上記の傷害細胞や死細胞に限

らず、それらの一部（例えば、細胞質、細胞膜、核、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、細胞質に含まれる細胞骨格、酵素、蛋白、RNA、DNA）又は細胞の破砕物に対しても示され得る。

[0028] 情報提示細胞から傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部を得る方法は、限定されないが、通常使用される方法に準じて行うことができる。傷害細胞を作製する場合には、例えば、当該技術分野において知られているような細胞の増殖を阻害する薬剤を用いることができる。このような薬剤としては、限定されないが、S期における細胞のパーセンテージを有意に低減させるものが挙げられ、典型的には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤、例えば、G1停止及びM期停止を誘発する薬剤などが含まれる。傷害細胞を作製するために使用され得る試薬の具体例としては、代謝拮抗薬／抗がん剤（例えば、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチン、クラドリビン、5-フルオロウラシル（5FU）、フロクスウリジン（FUDR）、シトシンアラビノシド（シタラビン）、メトトレキセート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキセド、カペシタビン、ゲムシタビン、シタラビン）；アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、メクロレタミン、ウラムスチン、メルファラン、クロラムブシル、チオテパ／クロラムブシル、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ブスルファン、ジブロモマンニトール、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、トリプラチンテトラニトレート、プロカルバジン、アルトレタミン、ダカルバジン、ミトゾロミド、テモゾロミド）；アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン）；抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン、ストレプトゾトシン、グラミシジンD、マイトマイシン類（例えば、マイトマイシンC）、デュオカルマイシン類（例えば、CC-1065）、カリケアマイシン類）；有糸分裂阻害剤（メイタンシノイド類、アウリスタチン類、ドラスタチン類、クリプトフィシン類、ビンカ

アルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンレルビン）、タキサン類（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル）、及びコルヒチン類；トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、テニポシド、ミザントロン）；並びにプロテアソーム阻害剤（例えば、ペプチジルボロン酸）が挙げられる。なお、これらの試薬の使用においては、試薬の濃度や使用方法、さらに培養条件などは通常行われている通りであり、当業者であれば適宜決定することができる。例えば、上記の試薬を用いる場合、傷害細胞を得るのに適した濃度としては、使用する試薬の種類に応じて変更可能であるが、 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ が好ましい。

[0029] 別の態様では、傷害細胞を作製するための手段としては、上記に列挙したような試薬の使用の他に、情報提示細胞にUV照射及び／又はX線処理を施行して行う方法であってもよい。UV照射及びX線処理は、当該技術分野において知られている条件を適宜選択して行うことができる。なお、UV照射及びX線処理は、上記の試薬と併用して行ってもよい。

[0030] 死細胞を作製するために使用され得る試薬には、上記の傷害細胞を作製するために使用され得る試薬が包含され、例えば、これらの使用濃度を高め、又は長期使用によってその目的を達成することができる。また、UV照射やX線処理を施す場合には、例えば、照射等の時間を長めに、UVやX線の強さを増大させることもよい。

[0031] 別の一態様では、傷害細胞又は死細胞を作製するための手段として、限定されないが、熱をかける、低温状態にする、酸又はアルカリ処理する、超音波又はボルテックスで処理する、凍結融解する、低酸素処理する、低栄養処理する、活性酸素処理する、などの方法が挙げられる。これらの手段の使用に関しては、当業者であれば適宜、条件を選択して使用することができる。

[0032] 本発明の方法では、上記方法によって得られた傷害細胞及び死細胞が作製できたかどうかを確認するための手段を含めてもよい。確認手段としては、限定されないが、顕微鏡下による観察、細胞傷害を測定する市販のキットの

使用、細胞から分泌された内容物の生理学的又は免疫学的な測定などが挙げられる。死細胞のうち、細胞がアポトーシスに起因した死細胞では、細胞表面の湾曲、核クロマチンの凝縮、染色体DNAの断片化などの独特の形態異常の観察に基づいて判断することができる。さらに、死細胞の定量的測定には、死細胞をトリパンブルーで染色する方法、又はテトラゾリウムによる比色分析（MTTアッセイ）を利用することができる。

[0033] （４）共培養条件

本発明は、多能性幹細胞と傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部を共培養することによって、インビトロで多能性幹細胞を分化誘導する方法に関する。本明細書で使用するとき、「共培養」とは、同一環境下において２種類以上の細胞（又は一部）を培養することを意味し、同一の培養容器又はシャーレ内に多能性幹細胞と傷害細胞等をそれぞれ所定数入れて培養することを指す。共培養の態様としては、（i）培養中の多能性幹細胞に傷害細胞等を添加して共培養する系、（ii）情報提示細胞から傷害細胞等を作製後、多能性幹細胞を添加して共培養する系、（iii）培養容器内に多能性幹細胞と傷害細胞等を所定する混在させて共培養する系などが挙げられる。

[0034] 多能性幹細胞の数と情報提示細胞由来の傷害細胞又は死細胞の数の比は、
1 : 10,000 ~ 10,000 : 1であり、例えば、1 : 10,000、
1 : 7,000、1 : 5,000、1 : 3,000、1 : 2,000、1 :
1,000、1 : 700、1 : 500、1 : 300、1 : 200、1 : 100、
1 : 70、1 : 50、1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 7、1 : 5、
1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、5 : 1、7 : 1、10 : 1、
20 : 1、30 : 1、50 : 1、70 : 1、100 : 1、200 : 1、300 : 1、
500 : 1、700 : 1、1,000 : 1、2,000 : 1、3,000 : 1、
5,000 : 1、7,000 : 1、10,000 : 1である。
細胞を培養するための培養液は、実際に培養する細胞に合せた培地であればよく、一般的には、DMEM、RPMI-1640、Ham's F12などを使用することができる。また、通常用いられる抗生物質、ウシ胎児血清

、遺伝子導入細胞選択用抗生剤などを0.1～10%の濃度で添加してもよい。

[0035] 培養温度などの培養条件は、通常の細胞培養条件に従うものとし、例えば、36～38℃、好ましくは37℃であり、さらに、4～6%CO₂、好ましくは5%CO₂雰囲気下であり得る。また、共培養の時間は、誘導され、最終的に得られる細胞種に依存するが、概ね、2～10日程度である。

[0036] (5) 分化誘導

本発明で使用するとき、「分化誘導」とは、何らかの手段によって、多能性幹細胞から特定の臓器、器官若しくは組織を構成する細胞又はその前駆細胞へと導くことを意味するが、内胚葉細胞、中胚葉細胞及び外胚葉細胞などの多種類の細胞を含む細胞群に分化させることも含む。本発明によれば、多能性幹細胞から特定の細胞への分化誘導は、多能性幹細胞を傷害細胞等と単に共培養することによって達成され、傷害細胞等以外の試薬やUV照射などを必要としないことを特徴とする。このような分化誘導は、多能性幹細胞の傷害細胞等に対する貪食性に起因するものであり、傷害又は死滅前の対応する情報提示細胞から分泌される何らかの液性因子やエキソソーム、又は情報提示細胞との細胞間の直接的接触によるものでないことが示唆された（実施例1参照）。

[0037] 分化誘導された細胞の確認は、当該技術分野において行われている手法により行うことができ、典型的には、細胞において所定の分化マーカーの遺伝子発現やタンパク質発現の有無を調べることによって行うことができる。このような手法としては、RT-PCR法、ノーザンブロット法、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法、ELISA法などが挙げられる。例えば、多能性幹細胞が心筋細胞に分化されたかどうかは、心筋細胞の分化マーカーであるNkx2.5 (NK-2 transcription factor related, locus 5)、GATA-4、トロポニン-T、ANP (心房性ナトリウム利尿ペプチド) の遺伝子発現が分化誘導された細胞において見られることを、RT-PCR法を用いてmRNAレベルで確認することができる（実施例3など）。

[0038] (6) 用途

多能性幹細胞が、傷害細胞、死細胞、及び又はその一部を貪食することにより、これらに由来する細胞に分化するという性質を利用して、多能性幹細胞を含有する細胞製剤の品質管理に応用することができる。本発明によれば、インビトロにおいて細胞製剤中に含有される細胞が、生存する多能性幹細胞であることを確認するための方法であって、

(a) 細胞製剤中の細胞と、傷害細胞、死細胞、及び又はその一部とを共培養し；及び

(b) 該細胞製剤中の細胞が、傷害細胞、死細胞、及び又はその一部に由来する外胚葉系細胞、中胚葉系細胞、及び／又は内胚葉系細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞に分化した場合に、該細胞製剤中に多能性幹細胞が生存していると判断する

ことを含む上記方法が提供される。ここで、多能性細胞（例えば、MuSe細胞）が、三胚葉系細胞（外胚葉系細胞、中胚葉系細胞、及び内胚葉系細胞）に分化したかどうかを確認する方法は、上述の通り、各種細胞マーカーの発現の有無を調べることによって可能である。

[0039] 本発明によれば、多能性幹細胞又は該多能性幹細胞が濃縮された細胞画分を、情報提示細胞由来の傷害細胞、死細胞、及び／又はその一部と共培養することを含む、インビトロで多能性幹細胞から情報提示細胞と同じ表現型及び機能を有する細胞を製造する方法を提供することができる。

[0040] 以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0041] 実施例 1 : MuSe 細胞の分化誘導メカニズムの解析

MuSe 細胞は、生体内で傷害部位から発せられる傷害シグナル（例えば、S1P）により、傷害部位に遊走し、生着後、「場の論理」に従って分化誘導されるが、MuSe 細胞が分化するメカニズムについて詳細には分かっていない。本実施例では、MuSe 細胞の分化誘導がどのようなメカニズム

で行われているのかについて、インビトロにおいて検証した。Muse細胞が、「場の論理」の情報をどのように受け取っているか、すなわち、分化誘導に関係すると考えられる要因がどのようなものを解明することは、「場の論理」が消失している慢性疾患や血管を介した到達が困難な組織や臓器、又は希少細胞の再生への応用の基礎となる。

[0042] Muse細胞が受け取っていると考えられる「場の論理」の情報として、情報提示細胞から分泌される液性因子やエキソソーム、又はこうした因子等に媒介されず、情報提示細胞との直接的な接触、あるいは傷害を受けた情報提示細胞をMuse細胞が貪食することなどが想定される。そこで、正常マウス心筋細胞及び傷害マウス心筋細胞を用いて、上記のうち、液性因子、エキソソーム、及び直接的接触によりMuse細胞の分化誘導の可能性について検討した。

[0043] (1) 正常マウス心筋細胞を用いた分化誘導

日本エスエルシー（株）から購入したC57BL/6-TG (CAG-EGFP) から生まれた生後1日目のマウス心臓より樹立した正常マウス心筋細胞を約10日間培養後、細胞の培養上清を回収し、これを液性因子による分化誘導の可能性を検討するための材料とした。次に、無血清培地で3日間培養した上記心筋細胞の培養上清を回収し、該培養上清をExoQuick Exosome Precipitation Solution (System Biosciences) と混合後、遠心分離をすることによって、心筋細胞より分泌されたエキソソームを得た (Douglas, D., et al., Molecular Biology, 728 (4), 235~246 (2011) 参照)。エキソソームが得られたことの確認は、HSP70を指標にウェスタンブロットによって行った。

[0044] 次に、ヒトMuse細胞は、国際公開第WO2011/007900号に記載された方法によって得た。Muse細胞を 1×10^4 細胞/ウェルになるようにプレート (Nunc multidish 6 nunc lon delta SL, Thermo, #140675) に播種し、24時間

培養した。続いて、上記で得られた正常マウス心筋細胞由来の培養上清又はエキソソームを添加し、培養を続けた。添加してから培養3日後、1週間後、2週間後、及び3週間後に、培養したMuse細胞を回収し、Muse細胞が情報提示細胞と同じ心筋細胞に分化しているかどうかを調べた。具体的には、回収されたMuse細胞から総RNAを抽出し、心筋分化マーカーであるNkx2.5 (NK-2 transcription factor related, locus 5)、GATA-4、トロポニン-T、及びANP (心房性ナトリウム利尿ペプチド) について、これらのヒト特異的なmRNA発現の有無をRT-PCRによって確認した。Nkx2.5及びGATA-4を心筋前駆細胞で発現している初期の分化マーカーとして、ANPを未分化型心筋細胞マーカーとして、トロポニン-Tを成熟心筋分化マーカーとして選択した。RT-PCRの陽性対象としてヒト胎児心臓、及び陰性対象としてマウス心筋細胞を試料として用いた。図1に示すように、Muse細胞は、正常マウス心筋細胞から得られた液性因子(培養上清)(図1A)及びエキソソーム(図1B)のいずれを用いた場合にも心筋細胞マーカーを発現しておらず、心筋細胞に分化誘導されなかった。

[0045] なお、RT-PCRにおいて検出対象として各種マーカーに使用したプライマーは、Nkx2.5 (NM_004387; 配列番号1)、GATA-4 (NM_002052; 配列番号4)、トロポニン-T (NM_000364; 配列番号7)、及びANP (NM_006172; 配列番号10) のヌクレオチド配列に基づいて、設計及び合成した。具体的には、以下の通りである。

(1) Nkx2.5

フォワードプライマー: 5' -CAGGACCAGACTCTGGAGCTG-3' (配列番号2) (配列番号1の821-841 ntに対応)

リバースプライマー: 5' -CGCCGAAGTTCACGAAGTTGT-3' (配列番号3) (配列番号1の1118-1098 ntに対応)

(2) GATA-4

フォワードプライマー：5' - AGCAGCTCCGTGTCCCAGACGT T - 3' (配列番号5) (配列番号4の1683-1705 nt に対応)

リバースプライマー：5' - CCAACTCACAGGAGAGATGCAGTGTG - 3' (配列番号6) (配列番号4の2139-2114 nt に対応)

(3) トロポニン-T

フォワードプライマー：5' - CTC AAAGACAGGATCGAGAG - 3' (配列番号8) (配列番号7の489-508 nt に対応)

リバースプライマー：5' - GATCTTTCATTTCAGGTGGTCA - 3' (配列番号9) (配列番号7の795-771 nt に対応)

(4) ANP

フォワードプライマー：5' - TCCAGCTCCTAGGTCAGACC - 3' (配列番号11) (配列番号10の149-168 nt に対応)

リバースプライマー：5' - TCTGGGCTCCAATCCTGTCC - 3' (配列番号12) (配列番号10の523-504 nt に対応)

[0046] 続いて、Muscle細胞が、正常マウス心筋細胞と直接接触することによって、分化誘導され得るかどうかを検討した。まず、正常マウス心筋細胞に対しては、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するように遺伝子導入を行った。次に、GFP標識した心筋細胞をプレート (Nunc multi dish 6 nunc lon delta SL, Thermo, #140675) に 3×10^4 細胞/ウェルで播種し、培養した。その後、予め核をDAPIで標識したヒトMuscle細胞を 1×10^4 細胞/ウェルで添加し、培養を続けた。培養開始から3日後、1週間後、2週間後、及び3週間後に、上記と同様に、心筋分化マーカーのヒト特異的なmRNA発現の有無をRT-PCRによって検討した (図1C)。上述した培養上清及びエキソソームの結果と同様に、心筋細胞マーカーの発現は観察されなかった。また、培養3日後及び7日後に、GATA-4の発現の有無を免疫染色によって検討し、蛍

光顕微鏡下で観察した結果を図1Dに示す。核が青色に標識されたM u s e細胞においては、G A T A-4の発現は認められなかった。上記の結果から、M u s e細胞は、正常マウス心筋細胞との細胞接触によっては分化誘導されないことが分かった。

[0047] (2) 傷害マウス心筋細胞を用いた分化誘導

傷害マウス心筋細胞を用いた場合において、M u s e細胞が分化され得るかどうかを検討した。傷害マウス心筋細胞の作製は、アポトーシスを誘導するエトポシドを用いて行った。簡単には、G F P標識したマウス心筋細胞を 3×10^4 細胞/ウェルで播種し、培養2日後に $50 \mu\text{M}$ のエトポシド(S I G M A, # E 1 3 8 3)を添加した。培養1日後、アポトーシス誘導マウス心筋細胞の培養上清を回収し、 1×10^4 細胞/ウェルで播種したヒトM u s e細胞を培養した。正常マウス心筋細胞の場合と同様に、培養開始から3日後、1週間後、2週間後、及び3週間後に心筋分化マーカーのヒト特異的なm R N A発現の有無をR T-P C Rによって検討した(図2A)。しかしながら、いずれのマーカーも確認できなかったことから、傷害細胞の培養上清に含まれる因子だけでは、M u s e細胞の心筋細胞への分化は起こらないことが判明した。

[0048] さらに、傷害マウス心筋細胞から分泌されたエキソソームを用いて検討した。上記と同濃度のM u s e細胞を播種し、エキソソームを添加した。添加から3日後、1週間後、2週間後、及び3週間後に、上記と同様に、心筋分化マーカーのヒト特異的なm R N A発現の有無をR T-P C Rによって検討した(図2B)。培養上清を用いた結果と同様に、エキソソームの添加によって、M u s e細胞は心筋細胞に分化誘導されなかった。

[0049] 実施例2：M u s e細胞の貪食性の検証

M u s e細胞は、フェライトを貪食することは報告されているが、傷害細胞、死細胞、又はその一部もまた貪食し得るのかについては検討されていない。そこで、M u s e細胞の貪食性について、P K H 2 6 P C Lビーズを用いて再検証した。

[0050] PKH26PCL（エタノール中、 1×10^{-3} Mストック；SIGMA，#PKH26PCL）は、マクロファージ、好中球、マイクログリアなどの貪食能を有する細胞を選択的に標識することができる色素であり、当該技術分野において広く使用されている。まず、GRP（緑色）及びDAPI（青色）で二重染色されたMuse細胞を培養し、PKH26PCL（赤色）を添加した。その後、24時間培養を行った。図3に示されるように、PKH26は、Muse細胞の細胞質に取り込まれていることが確認され、Muse細胞は貪食性を有することが再確認できた。約 $74.1 \pm 4.6\%$ のMuse細胞がPKH26PCLを取り込んでおり、Muse細胞は貪食能を有していることを確認した。

[0051] 実施例3：Muse細胞と傷害細胞の共培養による分化誘導

Muse細胞が、傷害細胞を貪食することにより、直接「場の論理」の情報を受け取り、分化するという可能性を検証した。

[0052] （1）中胚葉細胞（心筋細胞）への分化誘導

トポソメラーゼ阻害剤であるエトポシドを用いて、傷害心筋細胞を調製した。宿主となる心筋細胞として、実施例1で調製したGFP標識したマウス由来の心筋細胞を用いた。GPRマウス心筋細胞を 3×10^4 細胞／ウェルの細胞密度でプレートに播種し、1日間培養した培養系に、 $50 \mu\text{M}$ のエトポシドを各ウェルに添加した。その後、さらに1日間培養した。次に、標識したヒトMuse細胞を 1×10^4 細胞／ウェルで添加し、共培養を行った。共培養を開始してから3日後に、Muse細胞による傷害心筋細胞の貪食能を蛍光顕微鏡下で検証した。図4に示されるように、アポトーシスを起こしたGFPマウス心筋細胞と共培養したMuse細胞は、壊れた心筋細胞の一部（緑色）をMuse細胞内（赤色）に取り込んでいるため、Muse細胞の貪食能が確認された。

[0053] 次に、同培養系で、共培養を開始してから3日後、1週間後、2週間後、及び3週間後にそれぞれ細胞を固定し、Muse細胞が心筋細胞に分化誘導されたかどうかを検討した。心筋細胞の分化マーカーとしてのGATA-4

(心筋前駆細胞マーカー)、ANP(未分化型心筋細胞マーカー)、及びトロポニンI(心筋細胞の成熟分化マーカー)について免疫染色を行うことによって分化誘導を確認した。結果を図5に示す。アポトーシスを起こした心筋細胞と共培養したMuse細胞は、3日目と7日目において、GATA-4を発現していた(それぞれ図5Aと5B)。さらに、Muse細胞は、2週間目にはANPを発現し、3週間目にはトロポニンIを発現していた(それぞれ図5Cと5D)。このように、いずれの分化マーカーも発現しているため、Muse細胞は、傷害心筋細胞との共培養により、中胚葉系細胞である心筋細胞に分化したことが確認された。

[0054] さらに、上記で示された心筋細胞への分化誘導が、Muse細胞による傷害心筋細胞の貪食によるものであることを検証するために、培養系にアネキシンVを添加し、細胞の貪食能を抑制することによって、分化誘導が阻害されるのかどうかを検討した。上記の共培養と同じ培養系において、エトポシド(50 μ M)を添加してから1日後に、1 μ g/mLのアネキシンVを添加し、8時間培養した。その後、この系にMuse細胞(1×10^4 細胞/ウェル)を添加し、培養を継続した。アネキシンVを添加してから3日後、1週間後、2週間後、及び3週間後にMuse細胞から総RNAを抽出し、各マーカーの遺伝子発現の有無をRT-PCRによって確認した(図6)。

[0055] Nkx2.5及びGATA4は、分化過程の初期であって、より幼若な心筋細胞に発現する分化マーカーであり、3日後と1週間後のアネキシンVを添加していない試料では、Muse細胞は心筋に分化されているが、アネキシンVの添加した試料では、これらの分化マーカーの発現は観察されなかった。より後期に発現が見られるANPとトロポニンT(TNT)でも同様に、アネキシンVによりMuse細胞では分化マーカーの発現は観察されなかった。このように、Muse細胞の貪食を阻害すると、心筋細胞への分化は阻害されたことから、Muse細胞は死細胞又は死にかけた細胞(傷害細胞)を貪食することにより「場の論理」の情報を取得し、分化誘導されることが示された。

[0056] (2) 中胚葉系細胞（骨格筋細胞）への分化

マウスC2C12（横紋筋肉腫由来細胞株）（ATCC, #CRL-1772）を用いて、Muse細胞の中胚葉系細胞への分化誘導について検討した。エトポシド処理したC2C12細胞とGFP標識したMuse細胞を共培養し、分化誘導を試みた。具体的には、 5×10^4 細胞/ウェルの細胞濃度でC2C12細胞を播種し、エトポシドで処理後、同細胞濃度のMuse細胞を播種し、共培養を行った。共培養を開始してから14日後に、ミオゲニン（骨格筋細胞の分化マーカー）の発現の有無を免疫染色によって検討した。蛍光顕微鏡下で観察した結果及びMyoD発現のRP-PCRの結果をそれぞれ図7A及びBに示す。Muse細胞（緑色）は、ミオゲニン（赤色）を発現し、多核であり、さらにMyoDのmRNA発現（共培養開始から1週間後）を確認できたことから、傷害を誘導したC2C12との共培養によって中胚葉系細胞である骨格筋細胞に分化されることが示された。

[0057] なお、RT-PCRにおいて検出対象として各種マーカーに使用したプライマーは、MyoD（NM_002478；配列番号13）のヌクレオチド配列に基づいて、設計及び合成した。具体的には、以下の通りである。

フォワードプライマー：5' - GAGCAATCCAAACCAGCGGTTG - 3'（配列番号14）（配列番号13の631-652 ntに対応）

リバースプライマー：5' - TAGTAGGCGCCTTCGTAGCAG - 3'（配列番号15）（配列番号13の912-892 ntに対応）

[0058] (3) 外胚葉系細胞（神経細胞）への分化

傷害を誘導した神経細胞（Neuro2A, ATCC, #CCL-131）を用いて、Muse細胞の外胚葉系細胞への分化誘導について検討した。上記と同様にエトポシド処理で傷害を誘導した神経を作製し、Muse細胞と共培養した。共培養の開始から3日後と1週間後に、Muse細胞から総RNAを抽出し、分化誘導について検証した。より具体的には、神経細胞マーカーとして知られているNeuNのmRNA発現をRT-PCRによって

調べた。マウス胚（15日培養）及びヒトMSC-Muse細胞（L26）では、NeuNの発現はなかった。一方、傷害を誘導したNeuro2Aとの共培養の系では、共培養開始後1週間でMuse細胞においてNeuNの発現が確認された。これにより、Muse細胞は、傷害神経細胞との共培養により、外胚葉系細胞である神経細胞に分化されることが示された。

[0059] （4）内胚葉系細胞（ β 細胞）への分化

傷害を誘導したマウス β 細胞（NIT-1）（ATCC, #CRL-2055）を用いて、Muse細胞の内胚葉系細胞への分化誘導について検討した。上記と同様にエトポシド処理で傷害を誘導した β 細胞を作製し、Muse細胞と共培養した。共培養の開始から3日後と1～3週間後に、Muse細胞から総RNAを抽出し、分化誘導について検証した。より具体的には、 β 細胞の前駆細胞マーカーとして知られているNkx2.2とNeuroD1、並びに成熟 β 細胞マーカーとして知られているIslet1のmRNA発現をRT-PCRによって調べた。図9に示されるように、各種マーカーの経時的な発現の変化から、Muse細胞は、共培養の時間経過とともに前駆細胞から成熟 β 細胞へと分化していくことが確認された。Muse細胞は、傷害 β 細胞との共培養により、内胚葉系細胞である β 細胞に分化されることが示された。

[0060] なお、RT-PCRにおいて検出対象として各種マーカーに使用したプライマーは、Nkx2.2（NM_002509；配列番号16）、NeuroD1（NM_002500；配列番号19）、Islet1（NM_002202；配列番号22）のヌクレオチド配列に基づいて、設計及び合成した。具体的には、以下の通りである。

1) Nkx2.2

フォワードプライマー：5' - GACATAAATTTTGGGGTCT - 3'（配列番号17）（配列番号16の25-43ntに対応）

リバースプライマー：5' - GGTTCTGGAACCAAGATCTT - 3'（配列番号18）（配列番号16の584-566ntに対応）

2) *NeuroD1*

フォワードプライマー：5' - GCACAATTTGAGCAATTCA
T-3' (配列番号20) (配列番号19の1998-2017 ntに対応
)

リバースプライマー：5' - CAAGCTTGTGCAAGTAATGT
G-3' (配列番号21) (配列番号19の2144-2124 ntに対応
)

3) *Islet1*

フォワードプライマー：5' - GGCTGTTTCACCAACTGTA-
3' (配列番号23) (配列番号22の490-507 ntに対応)

リバースプライマー：5' - ACTCGATGTGATACACCTTG
-3' (配列番号24) (配列番号22の858-839 ntに対応)

[0061] (5) 内胚葉系細胞(肝細胞)への分化

傷害を誘導した肝細胞(マウス肝癌細胞株：*Hepa1-6*) (*ATCC*
, #CRL-1830)を用いて、*Muse*細胞の内胚葉系細胞への分化誘
導について検討した。上記と同様にエトポシド処理で傷害を誘導した肝細胞
を作製し、*Muse*細胞と共培養した。共培養の開始から3日後と1~2週
間後に、*Muse*細胞から総RNAを抽出し、分化誘導について検証した。
より具体的には、肝細胞の発生初期に見られる α -フェトプロテイン(*AFP*
P)のmRNA発現をR_P-PCRによって調べた。図10に示されるよう
に、*AFP*の発現は、共培養開始後1週間で観察され、*Muse*細胞は、傷
害肝細胞との共培養により、内胚葉系細胞である肝細胞に分化されることが
示された。

[0062] なお、R_T-PCRにおいて検出対象として各種マーカーに使用したプライ
マーは、*AFP* (NM_001134; 配列番号25)のヌクレオチド配列
に基づいて、設計及び合成した。具体的には、以下の通りである。

フォワードプライマー：5' - CCGAACTTTCCAAGCCATA
ACTG-3' (配列番号26) (配列番号25の740-762 ntに対

応)

リバースプライマー：5' - C A C T T C T C C A A T A A C T C C T G
G T A T C - 3' (配列番号27) (配列番号25の1195-1171 nt
t に対応)

産業上の利用可能性

[0063] 本発明のインビトロにおける多能性幹細胞を分化誘導する方法は、多能性幹細胞、特にM u s e細胞から共通の系を用いて、内胚葉細胞、中胚葉細胞、及び外胚葉細胞に分化誘導することができる。さらに、「場の論理」がすでに消失している慢性疾患や血管を介した到達が困難な組織や臓器、又は希少細胞の再生へと応用することができる。本発明の分化誘導法は、M u s e細胞などの多能性幹細胞から大量に、安定して、容易に、かつ低コストで分化細胞を誘導することができ、このようにして誘導された細胞は、外来遺伝子が導入されて分化誘導された細胞とは異なり、腫瘍化する可能性がなく、より安全に利用することができる。

[0064] 本明細書に引用する全ての刊行物及び特許文献は、参照により全体として本明細書中に援用される。なお、例示を目的として、本発明の特定の実施形態を本明細書において説明したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の改変が行われる場合があることは、当業者に容易に理解されるであろう。