

明 細 書

発明の名称：細胞分化度の調節方法

技術分野

[0001] 本発明は広く、細胞分化度の調節方法等に関する。

背景技術

[0002] 中胚葉由来の組織である骨、血管、心筋胞等は、間葉系幹細胞から各系列の前駆細胞を経由して分化する。間葉系幹細胞は、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの中胚葉由来の組織を産生する体性幹細胞である。間葉系幹細胞は、骨髓や、脂肪、歯髄等の組織に存在する。また、末梢の血液細胞は、造血幹細胞から各系列の造血前駆細胞を経由して分化する。骨髓系共通前駆細胞は、血小板、赤血球、さらにリンパ球以外の白血球細胞（好中球、マクロファージ、好塩基球、樹状細胞など）を産生する造血前駆細胞である。定常状態では骨髓中に存在するが、外傷時や感染時などに必要に応じて分化し、成熟血液細胞を供給する。産生される好中球、マクロファージ、好塩基球、樹状細胞などは、自然免疫の主役であり、各種病原生物からの防御、腫瘍や変性した自己の細胞の排除、アレルギー反応、急性、慢性炎症に寄与する。

[0003] これらの細胞は、炎症・アレルギーに対する薬剤のスクリーニング、体内異物を除去するための細胞療法のソースとして期待される。従来の技術では、臍帯血、骨髓血、ヒトES/iPS細胞などから、試験管内で分化誘導する方法が取られてきたが、いずれの手技も煩雑であり、また大量の細胞を準備することが困難である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Jie Z, Zhang Y, Wang C, Shen B, Guan X, Ren Z, et al. Large-scale ex vivo generation of human neutrophils from cord blood CD34+ cells. PLoS One. 2017;12(3).

非特許文献2 : Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, De Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF α . J Exp Med. 1996;184(2):695-706.

非特許文献3 : Lachmann N, Ackermann M, Frenzel E, Liebhaber S, Brenning S, Happle C, et al. Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. Stem Cell Reports. 2015;

非特許文献4 : Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, et al. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(8):3023-8.

非特許文献5 : Sweeney CL, Teng R, Wang H, Merling RK, Lee J, Choi U, et al. Molecular Analysis of Neutrophil Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells Delineates the Kinetics of Key Regulators of Hematopoiesis. Stem Cells. 2016;34(6):1513-26.

非特許文献6 : Takata K, Kozaki T, Lee CZW, Thion MS, Otsuka M, Lim S, et al. Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. Immunity. 2017;47(1):183-198.e6.

非特許文献7 : Cao X, Yakala GK, van den Hil FE, Cochrane A, Mummery CL, Orlova V V. Differentiation and Functional Comparison of Monocytes and Macrophages from hiPSCs with Peripheral Blood Derivatives. Stem Cell Reports. 2019;12(6):1282-97.

非特許文献8 : Ackermann M, Kempf H, Hetzel M, Hesse C, Hashtchin AR, Brinkert K, et al. Bioreactor-based mass production of human iPSC-

derived macrophages enables immunotherapies against bacterial airway infections. Nat Commun. 2018;9(1).

非特許文献9: Combination of immortalization and inducible death strategies to generate a human mesenchymal stromal cell line with controlled survival. Bourguine P, Le Magnen C, Pigeot S, Geurts J, Scherberich A, Martin I. Stem Cell Res. 2014 Mar;12(2):584-98

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 臍帯血、骨髓血由来造血前駆細胞を用いた手法では、増殖因子を加えることで、好中球、マクロファージなどが得られるが（非特許文献1、2参照）、臍帯血、骨髓血自体の増殖が有限であり、且つロット差が大きく、均一な質の細胞を大量に準備することが困難である。
- [0006] ヒトES/iPS細胞を用いた手法では、ES/iPS細胞自体はほぼ無限に増殖可能であるが、分化誘導法が煩雑であり、且つ、血液細胞への誘導効率が悪く、臨床応用レベルでの大量供給は困難である（非特許文献3～7参照）。例えば報告されているヒトiPS細胞からのマクロファージ分化では、250mLの培養系で、 10^8 細胞が限度である（非特許文献8参照）。薬剤スクリーニング、細胞療法いずれの観点からも従来の技術では、細胞数が大幅に不足しており、より効率の良い誘導法の開発が必須である。
- [0007] 骨髓球系の不死化細胞株としては、白血病患者から培養により低確率で樹立した細胞株は存在するが、白血病変異遺伝子が恒常的に発現した細胞であり、正常分化が不可能であり、成熟細胞を用いて行う薬剤スクリーニングは不可能である。また、ガン化のリスクがあり、細胞療法のソースとしては使用できない。
- [0008] 間葉系幹細胞系の不死化細胞株としては、ヒト骨髓由来間葉系間質細胞からhTERTを強制発現させることで作製した細胞株は存在するが（非特許文献9）、骨髓穿刺が必要であり、侵襲性の問題がある。当該論文では、任意の分

化段階のMSCを若返らせる（より未分化の状態にする）という記載はなく、前駆細胞へ若返らせる能力の有無については示されていない。

[0009] かかる事情に鑑み、本発明は、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、好中球、マクロファージ、好塩基球、樹状細胞などの細胞の安定した産生系の確立のために、新規な細胞分化の調節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

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために検討を重ねた結果、任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに高分化度を有する巨核球、及び骨髓球において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させることで、細胞分化度を調節できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち、本願発明は以下の発明を包含する。

[1]

(i) 任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに

(ii) 高分化度を有する巨核球、及び骨髓球
からなる群から選択される細胞において、
MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、
細胞分化度の調節方法。

[2]

前記細胞が、任意の分化度を有する間葉系幹細胞である、[1]に記載の方法。

[3]

前記細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現しない間葉系幹細胞である、[1]又は[2]に記載の方法。

[4]

前記細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現する間葉系幹細胞である、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5]

前記細胞が、任意の分化度を有する血管内皮細胞である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6]

前記細胞が、任意の分化度を有する平滑筋細胞である、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7]

前記細胞が、任意の分化度を有する血管平滑筋細胞である、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8]

前記細胞が、CD140b、KDR、又はCD34の細胞表面マーカーを発現する血管平滑筋細胞である、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9]

前記細胞が、任意の分化度を有する神経堤細胞である、[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[10]

前記細胞が、任意の分化度を有するリンパ球である、[1]～[9]のいずれかに記載の方法。

[11]

前記細胞が、CD41及びCD42bの細胞表面マーカーを発現する巨核球である、[1]～[10]のいずれかに記載の方法。

[12]

前記細胞が、CD14及びCD11bの細胞表面マーカーを発現する骨髓球である、[1]～[11]のいずれかに記載の方法。

[13]

MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[1]～[12]のいずれかに記載の方法。

[14]

BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、[1]～[13]のいずれかに記載の方法。

[15]

BCL-XL遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[1]～[14]のいずれかに記載の方法。

[16]

CDKN1A遺伝子及びP53遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[1]～[15]のいずれかに記載の方法。

[17]

[1]～[16]のいずれかに記載の方法で得られた細胞を培養する工程を含む、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の前駆細胞の製造方法。

[18]

[1]～[16]のいずれかに記載の方法で得られた細胞を分化する工程を含む、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の分化細胞の製造方法。

[19]

[1]～[18]のいずれかに記載の方法で得られた細胞。

[20]

[1]～[18]のいずれかに記載の方法で得られた細胞を含む、医薬組成物。

[21]

〔 1 9 〕 に記載の細胞、又は〔 2 0 〕 に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療又は予防方法。

〔 2 2 〕

MYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含む、

（ i ） 任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに

（ i i ） 高分化度を有する巨核球、及び骨髓球
からなる群から選択される細胞用の、細胞分化調節剤。

〔 2 3 〕

以下の工程を含む、マクロファージを製造する方法：

- 1）高分化度を有する骨髓球において、MYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子を強制発現させる工程、
- 2）工程 1 で得られた細胞を培養し、増殖させる工程、
- 3）工程 2 で得られた細胞におけるMYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子の強制発現を抑制し、マクロファージ分化条件下で更に培養することにより、マクロファージへの分化及び成熟を促進する工程。

〔 2 4 〕

工程 1 が、高分化度を有する骨髓球において、B C L - X L 遺伝子を強制発現させることをさらに含む、〔 2 3 〕 に記載の方法。

〔 2 5 〕

工程 3 が、工程 2 で得られた細胞におけるB C L - X L 遺伝子の強制発現を抑制することを更に含む、〔 2 3 〕 又は〔 2 4 〕 に記載の方法。

〔 2 6 〕

工程 1 が、高分化度を有する骨髓球において、C D K N 1 A 遺伝子及び／又はp 5 3 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することを更に含む、〔 2 3 〕 ～〔 2 5 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 2 7 〕

任意の分化度を有する間葉系幹細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する間葉系幹細胞の製造方法。

[28]

任意の分化度を有する間葉系幹細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現しない間葉系幹細胞である、[27]に記載の製造方法。

[29]

任意の分化度を有する間葉系幹細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現する間葉系幹細胞である、[27]又は[28]に記載の製造方法。

[30]

増殖能を有する間葉系幹細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現する、[27]～[29]のいずれか1項に記載の製造方法。

[31]

任意の分化度を有する血管内皮細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する血管内皮細胞の製造方法。

[32]

任意の分化度を有する平滑筋細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する平滑筋細胞の製造方法。

[33]

任意の分化度を有する平滑筋細胞が、血管平滑筋細胞である、[32]に記載の製造方法。

[34]

血管平滑筋細胞が、CD140b、KDR、又はCD34の細胞表面マーカーを発現する血管平滑筋細胞である、[33]に記載の製造方法。

[35]

任意の分化度を有する神経堤細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBM11遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する神経堤細胞の製造方法。

[36]

任意の分化度を有するリンパ球において、MYCファミリー遺伝子及びBM11遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有するリンパ球の製造方法。

[37]

CD41及びCD42bの細胞表面マーカーを発現する巨核球において、MYCファミリー遺伝子及びBM11遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する巨核球の製造方法。

[38]

CD14及びCD11bの細胞表面マーカーを発現するマクロファージにおいて、MYCファミリー遺伝子及びBM11遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有するマクロファージの製造方法。

[39]

不老化血管内皮細胞、及び、iPS細胞、ES細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を共培養する工程を含む、iPS細胞、ES細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞の、リンパ球細胞又はリンパ球前駆細胞への分化を促進する方法。

[40]

リンパ球細胞が、CD45及びCD56、又は、CD19及びCD45の細胞表面マーカーを発現する、[39]に記載の方法。

[41]

リンパ球細胞が、ナチュラルキラー細胞又はB細胞である、[39]又は[40]に記載の方法。

[42]

造血幹細胞又は造血前駆細胞が、臍帯血又はiPS細胞由来である、[39]～[41]のいずれかに記載の方法。

[43]

不老化血管内皮細胞がN o t c hリガンドを発現している、[39]～

[42]のいずれかに記載の方法。

[44]

N o t c hリガンドがD L L 4及び／又はJ a g g e d 1である、[43]に記載の方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに高分化度を有する巨核球、及び骨髓球において、M Y Cファミリー遺伝子及びB M I 1遺伝子を強制発現させることで、細胞分化度を調節することが可能になる。

[0013] 本発明によれば、さまざまなi P S細胞から高効率に間葉系、巨核球系、又は骨髓球系の不死化細胞株に誘導可能であることから異物特異的抗原を標的としたレセプター導入したi P S細胞、標的細胞への細胞毒性を強める遺伝子改変をしたi P S細胞、免疫拒絶反応を抑えたH L A n u l l i P S細胞、遺伝性疾患i P S細胞を用いることで、より生理的であり、薬剤スクリーニング、細胞療法、双方で優位性が期待できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、間葉系幹細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図2]図2は、間葉系幹細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図3]図3は、間葉系幹細胞をC D 9 0－細胞とC D 9 0＋細胞に分離し、M Bを強制発現して培養したときのフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図4]図4は、間葉系幹細胞の細胞増殖性をD o x o n時とD o x o f f時で比較した結果を示す。

[図5]図5は、間葉系幹細胞のD o x o n時及びD o x o f f時のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図6]図6は、間葉系幹細胞の終末分化誘導の結果を示す。

[図7]図7は、血管内皮細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図8]図8は、血管内皮細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図9]図9は、血管内皮細胞の形態観察の結果を示す。

[図10]図10は、血管内皮細胞の免疫染色の結果を示す。

[図11]図11は、血管内皮細胞のマーカー発現の結果を示す。

[図12]図12は、血管平滑筋細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図13]図13は、血管平滑筋細胞の免疫染色の結果を示す。

[図14]図14は、血管平滑筋細胞を前駆細胞リプログラミングする実験の模式図を示す。

[図15]図15は、図14の実験における、血管平滑筋細胞の形態観察の結果を示す。

[図16]図16は、図14の実験における、血管平滑筋細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図17-1]図17-1は、図14の実験における、血管平滑筋細胞のフローサイトメトリー解析（CD140b）の結果を示す。

[図17-2]図17-2は、図14の実験における、血管平滑筋細胞のフローサイトメトリー解析（KDR）の結果を示す。

[図17-3]図17-3は、図14の実験における、血管平滑筋細胞のフローサイトメトリー解析（CD34）の結果を示す。

[図18]図18は、図14の実験における、血管平滑筋細胞の免疫染色の結果を示す。

[図19]図19は、神経堤細胞の形態観察の結果を示す。

[図20]図20は、神経堤細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図21]図21は、神経堤細胞のフローサイトメトリー解析（CD271）の結果を示す。

[図22]図22は、神経堤細胞のフローサイトメトリー解析（CD271）の結果を示す。

[図23]図23は、Fibronectinコーティングが神経堤細胞に与える影響の評価結果を示す。

[図24]図24は、CD45+/CD56+細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図25]図25は、CD45+/CD56+細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図26]図26は、CD45+/CD19+細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図27]図27は、CD45+/CD19+細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図28]図28は、巨核球および骨髓球（マクロファージ）の細胞増殖性の評価結果およびフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図29]図29は、dox onにした不老化血管内皮細胞、dox offにした不老化血管内皮細胞、ヒトiPS細胞、ヒト大動脈内皮細胞（HAEC）、及びヒト臍帯血内皮細胞（HUV EC）のPCA（主成分分析）の結果を示す。

[図30]図30は、dox onにした不老化血管内皮細胞、dox offにした不老化血管内皮細胞、ヒトiPS細胞、ヒト大動脈内皮細胞（HAEC）、及びヒト臍帯血内皮細胞（HUV EC）の、DLL4及びJagged 1の発現解析の結果を示す。

[図31]図31は、不老化血管内皮細胞とCD34陽性臍帯血細胞とを共培養した場合の、CD45+/CD56+細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図32]図32は、不老化血管内皮細胞とCD34陽性臍帯血細胞とを共培養した場合の、CD45+/CD56+細胞の細胞増殖性の評価結果を示す。

[図33]図33は、iPS細胞由来ヒト造血幹細胞を不老化血管内皮細胞又は遺伝子組換え型DLL4と共培養した場合の、CD45+/CD19+細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

[図34]図34は、IL-3を投与して、不老化血管内皮細胞とiPS細胞由来ヒト造血幹細胞とを共培養した場合の、CD45+/CD56+細胞及びCD45+/CD19+細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本実施形態に係る細胞分化度の調節方法は、任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、高分化度を有する巨核球、骨髓球において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現量を変動させる（例、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現を抑制する）工程を含む。任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、高分化度を有する巨核球、骨髓球において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させることにより、強制発現させる前と比較して、低分化度の細胞（間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球）を得ることができる。高分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させることにより、強制発現前と比較して、低分化度の細胞（間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球）を得ることができる。低分化度の細胞は増殖能を有し得る。また、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現により得られた低分化度の細胞（間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球）におけるMYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現を抑制することにより、該発現抑制前と比較して、高分化度の細胞（間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球）を得ることができる。

[0016] 「分化度」または「細胞分化度」という場合、細胞の分化のレベルや程度、成熟の度合いを意味する。

細胞分化度は、細胞表面マーカーの発現量や程度に基づいて判断されてもよい。例えば、細胞が発現する細胞表面マーカーの発現量を検出して、分化度を判断してもよい。

細胞分化度は、相対的に判断されてもよい。例えば、ある細胞の分化過程において、ある分化度を有する細胞と、当該細胞とは異なる分化度を有する細胞とがある場合に、両細胞が有する分化度を比較して、相対的に低分化度を有する細胞であるか、相対的に高分化度を有する細胞であるか、が判断されてもよい。細胞の分化度が相対的に判断される場合において、分化度の判断は、細胞表面マーカーの発現の量や程度に基づいてなされてもよい。

本実施形態において、「任意の分化度を有する」又は「高分化度を有する」細胞は、iPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞から誘導することにより製造してもよく、本発明の細胞分化度を調節する方法により製造してもよい。

[0017] 本実施形態において、細胞分化度の調節は、細胞増殖（性）の向上であってもよく、細胞増殖の低下であってもよく、細胞増殖の向上及び低下を含んでいてもよい。すなわち、細胞増殖の低下は、細胞分化度を高分化度とする調節であり得て、細胞増殖の向上は、細胞分化度を低分化度とする調節であり得る。

[0018] 1-1. 間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC)

「間葉系幹細胞」とは、間葉系に属する細胞への分化能を有する幹細胞をいう。間葉系幹細胞には、脂肪間質細胞や、脂肪幹細胞を含んでよい。

[0019] 間葉系幹細胞は、当業者に周知の方法によりiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞から分化誘導して得てもよい。例えば、Fukutaら (Plos One, 2014, 9(12): e112291) の報告に従い、iPS細胞を、マトリジェルコートした培養皿上で、SB-431542及びCHIR99021存在下で培養することにより、神経堤細胞 (Neural Crest Cell: NCC) を誘導し、そのNCCを、フィブロネクチンコートし

た培養皿上で、EGF、FGF 2 及びSB-431542を含む培地中で培養することにより、NCCを増幅し、さらに、そのNCCを、フィブロネクチンコートした培養皿上で、10% FBS 及びFGF 2 を含む培地中で培養することにより、MSCを誘導することができる。

[0020] 間葉系幹細胞が誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、後述の間葉系幹細胞に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、間葉系幹細胞の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。

[0021] 間葉系幹細胞は、血管内皮細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、骨髄間質細胞、腱細胞、肝細胞、胆管上皮細胞、グリア細胞、神経細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞等へと分化することができる。

[0022] 本実施形態において、「間葉系幹細胞の前駆細胞」とは、骨血管内皮細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、骨髄間質細胞、腱細胞、肝細胞、胆管上皮細胞、グリア細胞、神経細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞からなる群から選択される細胞の前駆細胞であってもよい。

[0023] 本実施形態において、「間葉系幹細胞の分化細胞」は、血管内皮細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、骨髄間質細胞、腱細胞、肝細胞、胆管上皮細胞、グリア細胞、神経細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞からなる群から選択される細胞であってもよい。

[0024] 間葉系幹細胞は、例えば、CD90、CD73、及びCD105の細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。

[0025] 間葉系幹細胞は、フローサイトメトリー解析において、細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、間葉系幹細胞は、分化度が高まると、CD90の細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、高分化度を有する間葉系幹細胞は、CD90の細胞表面マーカーを発現しておらず、CD73及びCD105の細胞表面マーカーを発現してい

てもよい。一態様において、高分化度を有する間葉系幹細胞は、フローサイトメトリー解析において、CD90⁺、CD90⁺/CD73⁺、又はCD90⁺/CD105⁺の間葉系幹細胞である。iPS細胞等の多能性幹細胞からの間葉系幹細胞の樹立から、継代を重ねると、徐々に分化が進んで幹細胞性（増殖性）が低下し、10継代を超えると、高分化度を有する間葉系幹細胞（CD90⁺/CD73⁺、又はCD90⁺/CD105⁺）は生細胞の90%前後となり得る。また、間葉系幹細胞は、分化度が低まると、CD90の細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、低分化度を有する間葉系幹細胞は、CD90の細胞表面マーカーを発現しており、CD73及びCD105の細胞表面マーカーを発現していてもよい。一態様において、低分化度を有する間葉系幹細胞は、フローサイトメトリー解析において、CD90⁺、CD90⁺/CD73⁺、又はCD90⁺/CD105⁺の間葉系幹細胞である。別の態様において、低分化度を有する間葉系幹細胞は、フローサイトメトリー解析において、CD90⁺/CD73⁺、又はCD90⁺/CD105⁺の分画が生細胞の10%以上の検出を有しない間葉系幹細胞であってもよい。

[0026] 1-2. 血管内皮細胞

「血管内皮細胞」とは、血管内皮を構成する細胞、又はそのような細胞に分化することのできる細胞をいう。血管内皮細胞のうち、血液細胞に分化する能力を持つ胎児期の細胞を、造血性内皮細胞という。

生体における造血メカニズムには、幹細胞に由来する血液細胞が供給される造血メカニズムの他に、血管内皮細胞の発生により血液細胞が供給される造血メカニズムが知られている。

血管内皮細胞は、VE-カドヘリン（VE-cad）陽性、CD41陽性、CXCR4陽性の細胞であり得る。血管内皮細胞は、例えば、ES細胞、又はiPS細胞等の多能性幹細胞由来の細胞であってもよく、ES細胞又はiPS細胞からネット様構造物を誘導する過程で、誘導される。

[0027] ネット様構造物をヒトES細胞、ヒトiPS細胞等のヒト多能性幹細胞から調製するために適した細胞の培養条件は、用いる多能性幹細胞によって異なる

が、例えば、培地としては、最終濃度 15% の FBS を添加した IMDM を用い、その他無血清の場合においても適宜増殖因子及びサプリメント等を加えたものを使用することができる。さらに、ネット様構造物を効率的に形成させるために、VEGF を 0~100 ng/ml、より好ましくは、20 ng/ml 程度加えるのがよい。培養の環境としては、用いる ES 細胞又は iPS 細胞の種類によって異なるが、例えば、5% CO₂、36~38℃、好ましくは 37℃ の条件を用いることができる。ネット様構造物が形成されるまでの培養期間は、多能性幹細胞の種類や誘導条件によって異なるが、一般的には、多能性幹細胞をフィーダー細胞（例、10T1/2細胞）上に播いてから、7日後くらいまでに造血内皮細胞を含む細胞塊が形成され、14~16日後くらいまでに、血管内皮前駆細胞や造血前駆細胞を含むネット様構造物が形成される。

形成されたネット様構造物は、濾胞状構造になっており、内部には、血管内皮前駆細胞や造血前駆細胞が濃縮された状態で存在している。細胞塊に含まれる造血内皮細胞やネット様構造物の内部に存在する血管内皮前駆細胞や造血前駆細胞は、物理的な手段、例えば、滅菌済みの篩状器具（例えば、セルストレーナー等）に通すことにより、分離することができる。そして、CD34+ 血管内皮前駆細胞をセルソーターで単離し、VEGF 存在下で引き続き培養を継続することにより、血管内皮細胞を得ることができる。

[0028] 血管内皮細胞が誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、後述の血管内皮細胞に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、血管内皮細胞の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。

[0029] 血管内皮細胞は、例えば、VE-cad、CD31（PECAM1）、CD105、CD146等の細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。

[0030] 血管内皮細胞は、フローサイトメトリー解析において、細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、血管内皮細胞は、分化度が高まると、VE-cad、CD31、CD105、CD14

6等の細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、高分化度を有する血管内皮細胞は、VE-cad、CD31、CD105、CD146等の細胞表面マーカーを発現していてもよい。一態様において、高分化度を有する血管内皮細胞は、フローサイトメトリー解析において、VE-cad+/CD31+の血管内皮細胞であってもよく、CD105及びCD146からなる群から選択される1又は2の細胞表面マーカーを更に発現していてもよく、好ましくは、VE-cad+/CD31+/CD105+/CD146+である。また、血管内皮細胞は、分化度が低まると、VE-cad、CD31、CD105、CD146等の細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、低分化度を有する血管内皮細胞は、VE-cad、CD31、CD105及びCD146からなる群から選択される1、2、3又は4の細胞表面マーカーを発現していなくてもよい。一態様において、低分化度を有する血管内皮細胞は、フローサイトメトリー解析において、VE-cad+/CD31+であってもよく、CD105及びCD146からなる群から選択される1又は2の細胞表面マーカーを発現しない血管内皮細胞であってもよい。

[0031] 1-3. 平滑筋細胞

「平滑筋細胞」とは、平滑筋を構成する細胞、又はそのような細胞に分化することのできる細胞（例えば、平滑筋前駆細胞、平滑筋幹細胞など）をいう。また、「平滑筋細胞」とは、例えば、血管平滑筋細胞、消化管平滑筋細胞、膀胱平滑筋細胞、子宮平滑筋細胞等であってもよい。

[0032] 平滑筋細胞の中でも、血管平滑筋細胞は、ヒト等の哺乳動物のiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞から分化誘導して得てもよく、ES細胞又はiPS細胞からネット様構造物を誘導する過程で、誘導される。ネット様構造物に含まれるCD34-/VEGFR(KDR)+血管平滑筋前駆細胞をセルソーターで単離し、引き続き培養を継続することにより、血管平滑筋細胞を得ることができる。血管平滑筋細胞が得られたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、後述の血管平滑筋細胞に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付し

て、血管内皮細胞の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。

[0033] 平滑筋細胞は、間葉系幹細胞、神経堤細胞、骨髄細胞等に由来し得る。平滑筋細胞は、分化型平滑筋細胞と脱分化型平滑筋細胞が知られる。分化型平滑筋細胞と脱分化型平滑筋細胞は、当業者に周知の遺伝子発現パターンにより確認することができる。

[0034] 本実施形態において、「平滑筋細胞の前駆細胞」とは、前述した間葉系幹細胞の前駆細胞であってもよい。本実施形態において、「平滑筋細胞の分化細胞」とは、分化型平滑筋細胞又は脱分化型平滑筋細胞であってもよい。

[0035] 平滑筋細胞は、例えば、VEGFR (KDR)、Calponin、及び α SMAのマーカーの発現により特徴付けることができる。

[0036] 平滑筋細胞は、上述のマーカーの発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、血管平滑筋細胞は、分化度が高まると、Calponin、 α SMA等のマーカーの発現が増加する。すなわち、高分化度を有する血管平滑筋細胞は、Calponin、 α SMA等のマーカーを発現している。一態様において、高分化度を有する血管平滑筋細胞は、フローサイトメトリー解析において、Calponin+/ α SMA+の血管平滑筋細胞であってもよく、Calponin及び/ α SMAのマーカーを更に発現している。

[0037] 平滑筋細胞は、上記マーカーの他、当業者に周知の細胞表面マーカーの発現によっても特徴付けることができるが、平滑筋細胞の中でも、血管平滑筋細胞は、例えばCD140b、KDR、CD34等の細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。

[0038] 血管平滑筋細胞は、フローサイトメトリー解析において、細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、血管平滑筋細胞は、分化度が高まると、CD140b、KDR、CD34等の細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、高分化度を有する血管平滑筋細胞は、CD140b、KDR、CD34等の細胞表面マーカーを発現している。

い。一態様において、高分化度を有する血管平滑筋細胞は、フローサイトメトリー解析において、CD140b、KDR、及びCD34からなる群から選択される1、2又は3の細胞表面マーカーを更に発現していてもよい。また、血管平滑筋細胞は、分化度が低まると、CD140b、KDR、CD34等の細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、低分化度を有する血管平滑筋細胞は、CD140b、KDR、及びCD34からなる群から選択される1、2又は3の細胞表面マーカーを発現していなくてもよい。一態様において、低分化度を有する血管平滑筋細胞は、フローサイトメトリー解析において、CD140b、KDR、及びCD34からなる群から選択される1、2又は3の細胞表面マーカーを発現しない血管平滑筋細胞であってもよい。

[0039] 1-4. 神経堤細胞

神経堤細胞とは、遊走性の幹細胞であり、発生の過程で一時的に生じる神経堤という細胞集団由来の細胞のことをいう。

[0040] 神経堤細胞は、当業者に周知の方法によりiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞から分化誘導して得てもよい。例えば、Fukutara (Plos One, 2014, 9(12): e112291) の報告に従い、iPS細胞を、マトリジェルコートした培養皿上で、SB-431542等のALK5阻害剤及びCHIR99021等のGSK3阻害剤存在下で培養することにより、神経堤細胞(Neural Crest Cell: NCC)を誘導することができる。また、神経堤細胞の培養において、細胞の固定や成長を促進するために、培養皿やwell等をFibronectinでコーティングしてもよい。神経堤細胞の培養において、細胞の成長を促進するために、培地にEGFやFGF2等の成長因子を加えてもよい。一態様において、SB-431542等のALK5阻害剤、EGF及びFGF2を含む培地中で神経堤細胞を培養する。

[0041] 神経堤細胞が誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、後述の神経堤細胞に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有す

る細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、神経堤細胞の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。

[0042] 神経堤細胞は、神経細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、シュワン細胞、グリア細胞、歯、骨格筋細胞、平滑筋細胞、メラニン細胞等へと分化することができる。

[0043] 本実施形態において、「神経堤細胞の前駆細胞」とは、神経細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、シュワン細胞、グリア細胞、歯、骨格筋細胞、平滑筋細胞、及びメラニン細胞からなる群から選択される細胞の前駆細胞であってよい。

[0044] 神経堤細胞は、例えば、CD271等の細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。

[0045] 神経堤細胞は、フローサイトメトリー解析において、細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、神経堤細胞は、分化度が高まると、CD271等の細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、高分化度を有する神経堤細胞は、CD271等の細胞表面マーカーを発現しない神経堤細胞であってもよい。また、神経堤細胞は、分化度が低まると、CD271等の細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、低分化度を有する神経堤細胞は、CD271等の細胞表面マーカーを発現する神経堤細胞であってよく、高分化度を有する神経堤細胞よりも、更にCD271等の細胞表面マーカーを発現する神経堤細胞であってよい。

[0046] 培養における、培養皿やwell等のFibronectinによるコーティングの有無は、神経堤細胞の増殖や、CD271等の細胞表面マーカーの発現に影響しなくてもよい。

[0047] 1-5. リンパ球

リンパ球とは、白血球の一種であり、ナチュラルキラー細胞、B細胞、及びT細胞等に分類することができる。

[0048] リンパ球は、当業者に周知の方法により、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞等から分化誘導して得ることができる。リ

リンパ球を分化誘導する際、不老化血管内皮細胞をフィーダー細胞として多能性幹細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞等と共培養したり、DLL1、DLL4、Jagged 1等のNotch リガンドで、多能性幹細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞等をコーティングしたりすることで、より高効率で、リンパ球を分化誘導することができる。また、リンパ球の分化誘導は、IL7、IL15、IL2、IL7等のサイトカイン存在下で実施することが好ましい。

従って、本実施形態は、不老化血管内皮細胞、及び、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を共培養する工程を含む、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞の、リンパ球細胞又はリンパ球前駆細胞への分化を促進する方法、をも提供する。

該不死化血管内皮細胞は、本発明の細胞分化度の調節方法において、血管内皮細胞に、MYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBMI1遺伝子（並びに、任意的にBCL-X1遺伝子）を強制発現させることにより得られる増殖能を有する血管内皮細胞であり得る。該増殖能を有する血管内皮細胞は、強制発現させる前と比較して低分化度の細胞であり得る。該増殖能を有する血管内皮細胞における強制発現したMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBMI1遺伝子（並びに、任意的にBCL-X1遺伝子）を停止させて分化誘導した成熟血管内皮細胞も、不死化血管内皮細胞に含まれる。

細胞の分化には、Notchと、Notch リガンド（Delta-like 4（以下、DLL4）やJagged 1等）との相互作用によって伝達されるNotchシグナルが必要であることが知られているが、上記共培養に用いる不老化血管内皮細胞は、Notch リガンド、例えば、DLL4及び／又はJagged 1を発現していてもよい。不老化血管内皮細胞が、notchシグナル伝達に必要な、DLL4及び／又はJagged 1を発現することで、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞の、リンパ球細胞又はリンパ球前駆細胞への分化を促進することができる。不老化血管内皮細胞がDLL4及び／又はJagged 1を発現するこ

とで、広く様々な細胞への分化を促進することができるため、本実施形態の方法は、不老化血管内皮細胞、及び、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を共培養する工程を含む、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞の、任意の細胞への分化を促進する方法であってもよい。

共培養に用いるiPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞は、予め所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子、任意的に更にBCL-XL遺伝子）の発現カセットを組み込んだものであってよく、当該遺伝子を強制発現させながら、iPS細胞、ES細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞から、対象細胞への分化を誘導してもよい。その場合、不老化した対象細胞を分化誘導することができる。

共培養に用いる造血幹細胞又は造血前駆細胞は、生物から採取されたもの、例えば臍帯血、骨髓、末梢血由来であってよく、また、iPS細胞等の多能性幹細胞から誘導されたものであってよい。

iPS細胞等の多能性幹細胞から誘導したネット様構造物に造血前駆細胞が含まれるので、該ネット様構造物を造血幹細胞又は造血前駆細胞として共培養に付してもよい。

共培養に用いる不老化血管内皮細胞は、本実施形態に係る細胞分化度の調節方法で分化度が調節されることで不老化した細胞であってよい。また、共培養に用いる不老化血管内皮細胞は、マイトマイシンC等の抗生物質やガンマ線等の放射線照射により増殖しないよう処理した細胞であっても、処理されていない細胞であってもよい。

共培養の条件は、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞や、不老化血管内皮細胞の状態等に応じて当業者が適宜決定することができる。例えば、培養温度は約35℃～約42℃、約36℃～約40℃、又は約37℃～約39℃とすることができ、二酸化炭素濃度は例えば5%CO₂、酸素濃度は例えば20%O₂とすることができる。静置培養であっても、振とう培養であってもよい。振とう培養の場合の振とう速度も特に

限定されず、例えば、10rpm~200rpm、30rpm~150rpm等とすることができる。培地は、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、アスコルビン酸、TPOを含むイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）培地であってもよい。この場合、IMDM培地はさらにSCFを含んでいてもよく、さらにヘパリンを含んでいてもよい。さらに、ホルボールエステル（例えば、ホルボール-12-ミリストート-13-アセート；PMA）を加えてもよい。また、培地は、血清又は血漿を含有していてもよく、あるいは無血清でもよい。血清を用いる場合は、ヒト血清が好ましい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、モノチオグリセロール（MTG）、脂質、アミノ酸（例えば、L-グルタミン）、アスコルビン酸、ヘパリン、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、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有してもよい。サイトカインとしては、例えば、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、トロンボポエチン（TPO）、各種TPO様作用物質、幹細胞因子（SCF）、エリスロポエチン（EPO）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、インターロイキン3（IL3）、ITS（インスリン-トランスフェリン-セレナイト）サプリメント、ADAM（A Disintegrin And Metalloprotease）阻害剤等が例示される。

一態様において、Flt3L、SCF、IL-7及びIL-15を含む組み合わせをサイトカインとして添加する。該組み合わせは、更にIL-3を含んでいてもよい。一態様において、IL-3、Flt3L、SCF、IL-7及びIL-15を含む培地中で、不老化血管内皮細胞、及び、iPS細胞、ES細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を共培養し、次にFlt3L、SCF、IL-7及びIL-15を含む培地中で、共培養を継続する。継続培養用の培地は、IL-3を含まなくてもよい。

また、培地に不老化血管内皮細胞、及び、i P S細胞、E S細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を添加する順番は、任意であってよく、不老化血管内皮細胞を先に添加してもよく、i P S細胞、E S細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を先に添加してもよい。培地で培養している不老化血管内皮細胞に、i P S細胞、E S細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を添加することで共培養してもよく、培地で培養しているi P S細胞、E S細胞等の多能性幹細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞に、不老化血管内皮細胞を添加することで共培養してもよい。共培養は、ウェルプレート等で培養する二次元培養であってよく、生体内に近い環境での三次元培養であってもよい。

不老化血管内皮細胞と共培養することで、不老化血管内皮細胞と共培養しない場合や、遺伝子変異型D L L 4と共培養した場合よりも、対象細胞への分化を高効率で、誘導することが可能になる。すなわち、不老化血管内皮細胞と共培養した場合の方が、より多くの数及び／又は割合の対象細胞を分化誘導することが可能になる。

[0049] リンパ球細胞又はリンパ球前駆細胞が誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、後述のリンパ球に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、リンパ球の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。

[0050] リンパ球は、造血幹細胞や、リンパ球前駆細胞等に由来し得る。

[0051] 本実施形態において、「リンパ球前駆細胞」とは、ナチュラルキラー細胞、B細胞、及びT細胞からなる群から選択される細胞の前駆細胞であってよい。

[0052] リンパ球は、例えば、C D 4 5、C D 5 6、C D 1 9等の細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。C D 4 5は、赤血球や血小板以外の全ての血球が発現している細胞表面マーカーであり、C D 5 6は、ナチュラルキラー細胞に特徴的な細胞表面マーカーであり、C D 1 9は、B細胞に特徴的な

細胞表面マーカーである。例えば、ナチュラルキラー細胞はCD45及びCD56を発現していることを特徴とし、B細胞はCD45及びCD19を発現していることを特徴とする。

[0053] リンパ球は、フローサイトメトリー解析において、細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、リンパ球は、分化度が高まると、CD45、CD56、CD19等の細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、リンパ球の分化度が高まると、フローサイトメトリー解析において、CD45及びCD56の細胞表面マーカーの発現が確認されなくてもよく、CD45及びCD19の細胞表面マーカーの発現が確認されなくてもよく、CD45、CD56及びCD19の細胞表面マーカーの発現が確認されなくてもよい。また、リンパ球は、分化度が低くなると、CD45、CD56、CD19等の細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、リンパ球の分化度が低くなると、CD45、CD56、及びCD19からなる群から選択される1、2又は3の細胞表面マーカーを発現する細胞の数が増加する。

[0054] 1－6. 巨核球

「巨核球」とは、血小板を産生し得る細胞を意味し、赤血球系前駆細胞 (Megacaryocyte-erythrocyte progenitor: MEP) と呼ばれる場合もある。巨核球は、CD41a陽性、CD41b陽性、CD42b陽性の細胞であり得る。

[0055] 巨核球は、当業者に周知の方法によりiPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞から分化誘導して得てもよい。例えば、ヒトES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞から誘導したネット様構造物に含まれる造血前駆細胞をセルソーターで単離し、巨核球誘導条件（フィーダー細胞上で、TPO、SCF及びHeparin存在下）で培養することにより、巨核球を得ることができる（国際公開第2008/041370号、Takayama Blood 2008, 111(11):5298-5306）。或いは、ヒトES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞から誘導したネット様構造物に含まれる造血前駆細胞に、MYC及びBMI1を強制発現し、巨核球誘導条件（フィーダー細胞上で、

TPO、SCF及びHeparin存在下)で培養することにより、不死化巨核球を得て、この不死化巨核球のMYC及びBMI1の発現を止めることにより、成熟した巨核球を得ることができる(国際公開第2011/034073号)。

[0056] 巨核球が誘導されたことは、コロニー形成アッセイに付して、巨核球の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。

[0057] 巨核球は、血液細胞の一種であり、骨髓細胞(造血幹細胞)等に由来し得る。造血幹細胞は、造血前駆細胞へと分化することができ、造血前駆細胞は、赤血球、顆粒球、単球やマクロファージ、巨核球や血小板等の血液細胞へと分化することができる。顆粒球としては、骨髓球、前骨髓球、後骨髓球、骨髓芽球、桿状核球、分葉核球(好中球、好酸球、好塩基球等)等が挙げられる。

[0058] 本実施形態において、「巨核球の前駆細胞」とは、巨核球・赤芽球前駆細胞(MEP)であってもよい。

[0059] 本実施形態において、「巨核球の分化細胞」とは、巨核球、血小板等であってもよい。

[0060] 巨核球は、フローサイトメトリー解析において、例えば、CD41、及びCD42bの細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。

[0061] 巨核球は、フローサイトメトリー解析において、細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、巨核球は、分化度が高まると、CD41及びCD42bの細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、高分化度を有する巨核球は、CD41及びCD42bの細胞表面マーカーの発現をしていてもよい。高分化度を有する巨核球は、フローサイトメトリー解析において、CD41+/CD42b+の巨核球であってもよい。また、巨核球は、分化度が低まると、CD42bの細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、低分化度を有する巨核球は、CD41+であり、CD42bの細胞表面マーカーを発現していなくてもよい。低分化度を有する巨核球は、CD41+/CD42b-の巨核球であってもよい。

[0062] 1-7. 骨髓球

「骨髓球」とは、好酸球、単球、好中球および好塩基球を生成しうる細胞をいう。

- [0063] 骨髓球は、骨髓中の造血幹細胞から成熟して血液中の細胞成分である好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球等の白血球、赤血球、血小板等が産生される過程で得ることができる。骨髓球は、当業者に周知の方法により i P S 細胞や E S 細胞等の多能性幹細胞から分化誘導して得てもよい。
- [0064] 骨髓球が誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、後述の骨髓球に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、骨髓球の分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。
- [0065] 骨髓球は、血液細胞の一種であり、骨髓細胞（造血幹細胞）等に由来し得る。造血幹細胞は、造血前駆細胞へと分化することができ、造血前駆細胞は、赤血球、顆粒球、単球やマクロファージ、巨核球や血小板等の血液細胞へと分化することができる。顆粒球としては、骨髓球、前骨髓球、後骨髓球、骨髓芽球、桿状核球、分葉核球（好中球、好酸球、好塩基球等）等が挙げられる。
- [0066] 本実施形態において、「骨髓球の前駆細胞」とは、顆粒球・マクロファージ前駆細胞（GMP）であってもよい。
- [0067] 本実施形態において、「骨髓球の分化細胞」とは、骨髓球、分葉核球（好中球、好酸球、好塩基球等）、単球、マクロファージ等であってもよい。
- [0068] 骨髓球は、フローサイトメトリー解析において、例えば、CD 1 1 b、CD 4 3、CD 1 6、及びCD 1 4 の細胞表面マーカーの発現により特徴付けることができる。
- [0069] 骨髓球は、フローサイトメトリー解析において、上述の細胞表面マーカー発現パターンによりその分化度を特徴付けることができる。例えば、マクロファージは、分化度が高まると、CD 1 1 b 及びCD 1 4 の細胞表面マーカーの発現が増加する。すなわち、高分化度を有するマクロファージは、CD 1 1 b 及びCD 1 4 の細胞表面マーカーの発現をしてもよい。高分化度を有するマクロファージは、フローサイトメトリー解析において、CD 1 1 b + / C

D 1 4 +のマクロファージであってもよい。また、マクロファージは、分化度が低まると、C D 1 1 b +の細胞表面マーカーの発現が減少する。すなわち、低分化度を有するマクロファージは、C D 1 4 +であり、C D 1 1 bの細胞表面マーカーを発現していなくてもよい。低分化度を有するマクロファージは、C D 1 1 b - / C D 1 4 +のマクロファージであってもよい。

[0070] 2. 抽出する工程

細胞分化度の調節方法においては、所望の特定の分化度の細胞を抽出（単離又は精製）する工程をさらに含んでいてもよい。

特定の分化度の細胞の抽出は、MYCファミリー遺伝子及びBM I 1 遺伝子を強制発現させる前に行ってもよく、後に行ってもよい。

一態様において、MYCファミリー遺伝子及びBM I 1 遺伝子を強制発現させる前にこの抽出工程を行い、抽出した特定の分化度の細胞（例えば、高分化度の細胞）において、MYCファミリー遺伝子及びBM I 1 遺伝子を強制発現させてもよい。

別の態様において、MYCファミリー遺伝子及びBM I 1 遺伝子を強制発現させた、所望の特定の分化度の細胞（例えば、低分化度の細胞）を含む細胞集団を調製し、その後当該細胞集団から、所望の特定の分化度の細胞（例えば、低分化度の細胞）を抽出する。当該抽出した特定の分化度の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBM I 1 遺伝子を強制発現させてもよい。目的とする細胞を抽出し、抽出された細胞に対して、本発明の方法を適用することにより、あるいは本発明の方法を適用した細胞集団から、目的とする細胞を抽出して、当該細胞を継続して培養することにより、目的の細胞種を効率よく増殖させることができる。抽出する細胞は、抽出した細胞種の増殖性を効率的に向上させる観点から、間葉系幹細胞の単一種の細胞のみとすることや、血管内皮細胞のみとすることや、平滑筋細胞のみとすること等が好ましいが、これらの2種以上の細胞が混合した細胞集団としてもよい。

抽出する細胞としては、例えば、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球等を挙げることができる。目的と

する細胞の抽出は、当該細胞に特異的に発現している（又は発現していない）細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、フローサイトメトリー解析、パニング、磁気ビーズ等の当業者に周知の方法により行うことができる。間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、骨髓球の抽出は、上述の細胞表面マーカー発現パターンを満足する細胞を単離することにより行うことができる。

抽出操作後の細胞集団に含まれる目的とする細胞の割合が、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）となるように、目的とする細胞の単離を行うことができる。目的とする細胞のシングルセルを単離してもよい。

[0071] 3. BCL-XL 遺伝子

本発明の細胞分化度を調節する方法は、任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、高分化度を有する巨核球、骨髓球において、BCL-XL 遺伝子を強制発現させる工程をさらに含んでいてもよい。MYCファミリー遺伝子及びBMI1 遺伝子に加えて、BCL-XL 遺伝子を発現させることにより、細胞分化度を低分化度とする調節の更なる促進が期待できる。

BCL-XL 遺伝子の上記強制発現の期間は当業者が適宜決定することができる。

[0072] BCL-XL 遺伝子は、細胞のアポトーシスを抑制する機能を有する遺伝子である。

[0073] MYCファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、及び／又はBCL-XL 遺伝子の強制発現は、同時に行ってもよく、順次行ってもよい。

例えば、MYCファミリー遺伝子とBMI1 遺伝子を強制発現させ、続いてBCL-XL 遺伝子を強制発現させて、細胞分化度を低分化度に調節した細胞を得てもよい。また、MYCファミリー遺伝子とBMI1 遺伝子とBCL-XL 遺伝子を同時に強制発現させて、細胞分化度を低分化度に調節した細胞を

得てもよい。細胞分化度を低分化度に維持する場合には、培養期間中、MYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子に加えてB C L - X L の強制発現を維持することが好ましい。

[0074] MYCファミリー遺伝子、B M I 1 遺伝子、B C L - X L 遺伝子等の遺伝子を細胞内で強制発現させる場合、当業者において周知のいかなる方法により実施してもよい。例えば、遺伝子を、レンチウイルスやレトロウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやプラスミドベクター、エピソードベクター等の非ウイルスベクターによる遺伝子導入システムを利用して、細胞内に導入し、発現させてもよい。トランスポゾンを用いて非ウイルス的に、目的遺伝子を細胞のゲノムに組み込み、安定発現細胞株を樹立した後に、不要となった導入遺伝子をトランスポゾネースにより除去する方法（例、P i g g y B a c T r a n s p o s o n システム）を用いてもよい。

対象細胞に、所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子、任意的に更にB C L - X L 遺伝子）の発現ベクター（例、ウイルスベクター）をトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子、任意的に更にB C L - X L 遺伝子）の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、E S 細胞、i P S 細胞）から対象細胞を誘導し、その段階で当該遺伝子を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びB M I 1 遺伝子、任意的に更にB C L - X L 遺伝子）の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、E S 細胞、i P S 細胞）において、当該遺伝子を強制発現させながら、該多能性幹細胞から、対象細胞への分化を誘導してもよい。遺伝子導入ベクターにより遺伝子発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該遺伝子を作用可能に連結し、これを遺伝子導入ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的遺伝子を発現させてもよい。

該プロモーターは外来性プロモーターであり得る。本明細書中、遺伝子の「内在性」プロモーターとは、ゲノム中における該遺伝子と自然な状態で連結されているプロモーターを意味し、遺伝子の「外来性」プロモーターとは、遺

伝操作（すなわち分子生物学的技法）によって、人為的に該遺伝子の近位に、該遺伝子の転写が、作用可能に連結されているプロモーターによって指示されるように配置されているものを意味する。ここで、「作用可能」に連結するとは、該プロモーターによって目的遺伝子がシスに支配され、目的遺伝子の所望の発現が実現されるようにプロモーターと目的遺伝子を連結することを意味する。外来性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得る。恒常的プロモーターとしては、例えば、CMVプロモーター、EF1プロモーター、ユビキチンプロモーターなどを挙げることができる。調節性プロモーターとは、誘導可能又は抑制解除可能なプロモーターを意味し、リプレッサー又はインデューサーのいずれか一方と結合することのできる、プロモーターと共に働くDNA配列を有するプロモーターを指す。プロモーターが誘導されるか或いは抑制解除されると「オンの状態」になり、プロモーターが誘導されないか或いは抑制解除されていない状態では、プロモーターは「オフの状態」となる。調節性プロモーターの例としては、テトラサイクリン反応性プロモーター、ステロイド反応性プロモーター、メタロチオネインプロモーターなどの薬剤反応性プロモーターを挙げることができる。テトラサイクリン反応性プロモーターとは、テトラサイクリン又はその誘導體（例えば、ドキシサイクリン（Dox））の存在または非存在によって可逆的に制御される、既知の調節性プロモーターである。テトラサイクリン反応性プロモーターは、内部にテトラサイクリン応答エレメント（TRE）が配置されたプロモーターであり、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）タンパク質又はテトラサイクリン制御性トランス活性化因子（tTA）のTREへの結合により、活性化される（即ち、目的タンパク質の発現を誘導する）プロモーターである。rtTAタンパク質はDox存在下でTREに結合し、一方tTAタンパク質はDox非存在下でTREに結合して、TRE配列の下流のプロモーターと機能的に連結された目的遺伝子の発現を誘導する。テトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン反応性プロモーターと機能的に連結された該遺伝子と、rtTA又はtTAタンパク質とが

導入された細胞を、Dox存在下で培養することにより、Dox依存的に該遺伝子の発現を誘導又は抑制することができる。外来性プロモーターは、好ましくは調節性プロモーターである。調節性プロモーターを用いることにより、例えば、薬剤添加などの制御により目的遺伝子を誘導的に発現させることもできる。このような薬剤による遺伝子発現システムは、MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の所望の発現制御を実現するために、当業者において、適当なシステムを容易に選択することができる。このような発現を行うために、市販のキットなどを使用してもよい。また、発現制御の目的遺伝子であるMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子は、それぞれ別々のベクターに挿入してもよいし、同一のベクターに挿入してもよい。

[0075] MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、及びBCL-XL遺伝子は、細胞分化度の低分化度への調節を促進するが、分化細胞（例、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）の終末分化を阻害し得るために、終末分化工程に入る前にこれら遺伝子の発現を抑制してもよい。細胞内のこれら遺伝子発現を抑制することにより、機能的でより成熟した分化細胞（例、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、巨核球、血小板、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球、巨核球）が誘導されやすくなる。

[0076] 細胞内におけるMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の発現の抑制は、例えば、前述の調節性プロモーターを用いた薬剤誘導的な発現システムによる発現の誘導を、薬剤等の除去により解除することで達成してもよい。あるいは、導入したMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等をCre/Loxシステムなどを使用して除去し、これらの遺伝子の発現を抑制的に制御してもよい。MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の発現を抑制的に調節するために、市販のキット等を適宜使用することもできる。

[0077] 上記各遺伝子の強制発現及びその解除（抑制）のために *T e t - o n*（登録商標）又は *T e t - o f f*（登録商標）システムのような市販の薬剤応答性の遺伝子発現誘導システムを用いてもよい。この場合、強制発現させる工程においては、対応する薬剤、例えば、テトラサイクリン又はドキシサイクリンを培地に含有させ、これらを培地から除くことによって強制発現を抑制してもよい。薬剤（例えば、ドキシサイクリン）応答性の遺伝子発現誘導システムを用いる場合、当該薬剤誘導性に細胞（任意の分化度を有する間葉系幹細胞等）を長期間安定増殖させることが可能であり、任意のタイミングで培地から当該薬剤を除去するだけで、増殖を抑制すると同時に、所望の分化細胞を大量に準備可能である。あるいは、温度感受性の遺伝子発現制御システムや、光感受性の遺伝子発現制御システムを用いてもよい。

[0078] 遺伝子の強制発現及び強制発現の解除（抑制）は、国際公開第2011/034073号（上掲）及び米国特許出願公開第2012/0238023号、国際公開第2012/157586号（上掲）及び米国特許出願公開第2014/0127815号、国際公開第2014/123242号及び米国特許出願公開第2016/0002599号、又は *Nakamura S et al, Cell Stem Cell. 14, 535-548, 2014* に記載された方法、その他の公知の方法又はそれに準ずる方法で行うことができる。また、国際公開第2015/046229号、国際公開第2016/125364号、又は国際公開第2020/045651号、その他の公知の方法又はそれに準ずる方法で行うことができる。

[0079] 4. *CDKN1A* 遺伝子

本発明に係る細胞分化度を調節する方法は、任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに高分化度を有する巨核球、及び骨髓球において、*CDKN1A* 遺伝子及び *p53* 遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程を含んでいてもよい。

ここで、発現とは、転写及び翻訳を含む概念で用いられ、発現を阻害するという場合、転写レベルで阻害することも翻訳レベルで阻害することも含む。本発明の方法において、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することにより、細胞分化度の調節（低分化度への調節）の更なる向上が期待できる。

[0080] CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) 遺伝子は細胞周期の阻害因子p21をコードしており、癌抑制遺伝子であるp53遺伝子の下流遺伝子としても知られている。活性化したp53タンパク質は転写因子として働き、p53下流遺伝子群の発現を増加させる。そのため、本明細書で使用する場合、「遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する」とは、対象の遺伝子の発現やその発現産物（例えば、CDKN1A遺伝子の場合にはp21）の機能を直接抑制することによって達成してもよいし、対象の遺伝子の上流にある遺伝子の発現やそれらの発現産物の機能を制御することで達成することもできる。ただし、本明細書においては、CDKN1A遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する場合、その対象となるCDKN1A遺伝子の上流遺伝子の中に、p53遺伝子、更にはp53遺伝子の上流にある別の癌抑制遺伝子であるINK4A遺伝子及びARF遺伝子は含まれない。

[0081] CDKN1A遺伝子のみならず、p53遺伝子の発現、あるいはそれらの発現産物の機能を抑制することが好ましい。

[0082] 上記各遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制は、既知の方法により行うことができ、例えば、各遺伝子の発現を特異的に抑制し得るsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸（「発現抑制核酸」という。）、又はこれらの発現抑制核酸を発現し得る発現ベクターなどの、種々の分子を細胞に導入することにより行うことができる。あるいは、それ以外の技術、例えばゲノム編集技術などを利用し、遺伝子をノックダウンしてもよい。例えば、CRISPR-Casシステムを利用して遺伝子をノックダウンする場合、その遺伝子を標的

とするガイドRNAと、dCasのような不活化Casとリプレッサードメインの融合タンパク質などが用いられる。

[0083] siRNAは、典型的には、標的遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列又はその部分配列と相補的な配列を有するRNAとその相補鎖からなる2本鎖オリゴRNAである。siRNAの長さは、哺乳動物細胞に用いられる場合、通常19～30塩基程度、好ましくは21塩基～25塩基程度である。これらのRNAのヌクレオチド配列は、発現が抑制される遺伝子の配列情報により当業者が適宜設計することができる。siRNAの代わりにshRNAを使用することもできる。

[0084] アンチセンス核酸とは、標的mRNA（成熟mRNA又は初期転写産物）を発現する細胞の生理的条件下で標的mRNAと特異的にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含み、かつハイブリダイズした状態で標的mRNAにコードされるポリペプチドの翻訳を阻害し得る核酸を意味する。アンチセンス核酸は、一般的には10塩基長～100塩基長、好ましくは15塩基長～30塩基長の一本鎖核酸である。アンチセンス核酸の種類は、DNA又はRNAであってもよいし、あるいはDNAとRNAのキメラであってもよい。アンチセンス核酸のヌクレオチド配列は、発現が抑制される遺伝子の配列情報により当業者が適宜設計することができる。

[0085] 上記の技術に加え、各遺伝子の発現を抑制することが知られている化合物を使用することもできる。例えば、CDKN1A遺伝子の発現を抑制する化合物として、UC2288、ブチロラクトンI、LLW10、ソラフェニブ、ステリグマトシスチンなどのp21阻害剤が知られている。また、p53阻害剤としては、ピフィスリン α 、ナトリン-3、ReACp53、RG7388などが知られている。

[0086] あるいは、遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制のために、公知の技術を用いて対象の遺伝子をノックアウトしてもよい。遺伝子のノックアウトとは、遺伝子の全部又は一部がその本来の機能を発揮しないように破壊又は変異されていることを意味する。遺伝子は、ゲノム上の一つの対立遺伝子が機能

しないように破壊又は変異されていてもよい。また、複数の対立遺伝子が破壊又は変異されていてもよい。ノックアウトは、既知の方法により行うことができ、例えば、標的遺伝子との間で遺伝的組換えが起こるように作られたDNAコンストラクトを細胞に導入することによりノックアウトする方法や、TALENやCRISPR-Casシステムなどのゲノム編集技術を利用して、塩基の挿入、欠失、置換導入によりノックアウトする方法が挙げられる。

[0087] その他、各遺伝子の転写及び転写産物を抑制する化合物、又は産生されたタンパクの標的タンパクとの結合阻害剤（p53結合阻害：ピフィスリン α 、ナトリン-3、ReACp53、RG7388等；p21結合阻害：UC2288、ブチロラクトンI、LLW10、ソラフェニブ、ステリグマトシスチン等）などを使用してもよい。

[0088] 遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制は、上述の方法により行うことができる。

[0089] CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現の抑制は、好ましくは、各遺伝子に対する発現抑制核酸を発現する発現ベクターを細胞に導入することにより行う。CDKN1A遺伝子、p53遺伝子等の遺伝子に対する発現抑制核酸を細胞内で強制発現させる場合、当業者において周知のいかなる方法により実施してもよいが、例えば、該発現抑制核酸をコードする核酸を、レンチウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターやプラスミドベクター、エピソードベクター等の非ウイルスベクターによる遺伝子導入システムを利用して、細胞内に導入し、発現させてもよい。トランスポゾンを用いて非ウイルス的に、発現抑制核酸をコードする核酸を細胞のゲノムに組み込み、発現抑制核酸の安定発現細胞株を樹立した後に、不要となった導入核酸をトランスポポネースにより除去する方法（例、PiggyBac Transposonシステム）を用いることもまた好ましい。対象細胞に、所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現ベクター（例、ウイルスベクター）をトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現力

セットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）から対象細胞を誘導し、その段階で当該siRNA、shRNA又はアンチセンス核酸を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）において、当該発現抑制核酸を強制発現させながら、該多能性幹細胞から、対象細胞への分化を誘導してもよい。発現ベクターを用いて細胞内で発現抑制核酸の発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該発現抑制核酸をコードする核酸（例、DNA）を作用可能に連結し、これを発現ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的とする発現抑制核酸を発現させてもよい。該プロモーターは外来性プロモーターであり得る。外来性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは恒常的プロモーターである。恒常的プロモーターの例としては、siRNAやshRNA等の比較的小さいRNAを発現する場合、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーター、レトロウイルス性LTRプロモーター、アデノウイルスVAIプロモーター、5S rRNAプロモーター、7SK RNAプロモーター、7SL RNAプロモーター等のpoly III系プロモーターを用いることが好ましい。CDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸と、p53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、それぞれ別々の発現ベクターに挿入してもよいし、同一の発現ベクターに挿入してもよい。

[0090] 本実施形態において、CDKN1A遺伝子又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制は、MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、又はBCL-XL遺伝子のいずれかの強制発現と同時であってもよいが、好ましくはBCL-XL遺伝子の強制発現と同時か、あるいは例えば細胞増殖の低下が確認された後に実施することができる。一例として、ある時点の細胞増殖率を直近の細胞増殖率と比較し（例えば、一週間ごとに細胞の増殖を確認したとして、ある週の細胞増殖率をその一週間前の増殖率と比較して）、増殖率が1/2以下になった状態が確認された後に実施することができる。細胞増殖の低下

は、限定することを意図するものではないが、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現直後から約30日後、約40日後、約50日後、約60日後、約70日後、約80日後、又は約90日後まで見られる。一態様において、対象細胞において、MYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBMI1遺伝子を強制発現させ、これと並行して、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。一態様において、対象細胞において、MYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）、BMI1遺伝子、及びBCL-XL遺伝子を強制発現させ、これと並行して、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。

[0091] 5. ホモログ

本明細書で使用する場合のMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子等の各遺伝子は、それらの公知の核酸配列、例えばcDNA配列でコードされるものを意味する。各遺伝子には、公知の核酸配列の相同性に基づいて同定されるホモログも含まれ得る。「ホモログ」とは、遺伝子のcDNA配列が、その遺伝子の核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。

[0092] MYCファミリー遺伝子のうち、c-MYC遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号1で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号1で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号1で表される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号1で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNA又はRNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタン

パク質が、細胞周期を阻害するもののことである。あるいは、配列番号 1 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる cDNA とは、配列番号 1 で示される配列中の 1 又は複数個、例えば 1 ～ 10 個、好ましくは数個、例えば 1 ～ 5 個、1 ～ 4 個、1 ～ 3 個、1 ～ 2 個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなる DNA であって、これらの DNA によってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。c-MYC 遺伝子は、不安定化ドメイン (DD) と融合させた c-MYC をコードする遺伝子であってもよい。不安定化ドメインは、ProteoTuner 社または Clontech 社から購入して用いることができる。

[0093] 配列番号 1 で示される配列は、以下の配列である。

```
atgcccctca acgtttagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag
ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg
cagcccccg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc caccgcccc
ctgtccccta gccgccgctc cgggctctgc tcgccctcct acgttgcggt cacacccttc
tcccttcggg gagacaacga cggcgggtggc gggagcttct ccacggccga ccagctggag
atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg cgaccgagc
gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg ctctcggcc
gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc
agccgaacc ccgcccgcgg ccacagcgtc tgctccacct ccagcttgta cctgcaggat
ctgagcgccg ccgctcagag tgcatcgacc cctcggtggt ctccccctac cctctcaacg
acagcagctc gcccaggtcc tgcgcctcgc aagactccag cgccttctct ccgtcctcgg
attctctgct ctctcgcagc gagtcctccc cgcagggcag ccccgagccc ctggtgctcc
atgaggagac accgcccacc accagcagcg actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag
aaatcgatgt tgtttctgtg gaaaagaggc aggctcctgg caaaaggta gagtctggat
caccttctgc tggaggccac agcaaacctc ctcacagccc actggtcctc aagagggtgcc
acgtctccac acatcagcac aactacgcag cgcctccctc cactcggaag gactatcctg
ctgccaagag ggtcaagttg gacagtgtca gagtctgag acagatcagc aacaaccgaa
aatgcaccag ccccggtcc tcggacaccg aggagaatgt caagaggcga acacacaacg
```

tcttggagcg ccagaggagg aacgagctaa aacggagctt ttttgcctg cgtagaccaga
tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc ccaaggtagt tatccttaaa aaagccacag
catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc aaaagctcat ttctgaagag gacttgttgc
ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaa

[0094] B M I 1 遺伝子のホモログとは、その c D N A 配列が、例えば、配列番号 2 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号 2 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる c D N A とは、配列番号 2 で示される配列からなる D N A と、約 6 0 % 以上、好ましくは約 7 0 % 以上、より好ましくは約 8 0 % 以上、例えば 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、よりさらに好ましくは約 9 0 % 以上、例えば 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、最も好ましくは約 9 9 % 以上の同一性を有する配列からなる D N A、若しくは、配列番号 2 で示される核酸配列に相補的な配列からなる D N A 又は R N A とストリンジントな条件下でハイブリダイズできる D N A であって、これらの D N A によってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。あるいは、配列番号 2 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる c D N A とは、配列番号 2 で示される配列中の 1 又は複数個、例えば 1 ～ 1 0 個、好ましくは数個、例えば 1 ～ 5 個、1 ～ 4 個、1 ～ 3 個、1 ～ 2 個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなる D N A であって、これらの D N A によってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。

[0095] 配列番号 2 で示される配列は、以下の配列である。

atgcatcgaa caacgagaat caagatcact gagctaaatc cccacctgat gtgtgtgctt
tgtggagggt acttcattga tgccacaacc ataatagaat gtctacattc ctctgtgtaa
acgtgtattg ttcgttacct ggagaccagc aagtattgtc ctatttgtga tgtccaagtt
cacaagacca gaccactact gaatataagg tcagataaaa ctctccaaga tattgtatac
aaattagttc cagggtcttt caaaaatgaa atgaagagaa gaagggattt ttatgcagct
catccttctg ctgatgctgc caatggctct aatgaagata gaggagaggt tgcagatgaa

gataagagaa ttataactga tgatgagata ataagcttat ccattgaatt ctttgaccag
aacagattgg atcggaaagt aaacaaagac aaagagaaat ctaaggagga ggtgaatgat
aaaagatact tacgatgccc agcagcaatg actgtgatgc acttaagaaa gtitttcaga
agtaaaatgg acatacctaa tactttccag attgatgtca tgtatgagga ggaaccttta
aaggattatt atacactaat ggatattgcc tacatttata cctggagaag gaatggtcca
cttcattga aatacagagt tcgacctact tgtaaaagaa tgaagatcag tcaccagaga
gatggactga caaatgctgg agaactggaa agtgactctg ggagtgacaa ggccaacagc
ccagcaggag gtattccctc cacctcttct tgtttgccta gccccagtac tccagtgcag
tctcctcatc cacagtttcc tcacatttcc agtactatga atggaaccag caacagcccc
agcggtaacc accaatcttc ttttgccaat agacctcgaa aatcatcagt aaatgggtca
tcagcaactt cttctggttg a

[0096] BCL-XL 遺伝子のホモログとは、その cDNA 配列が、例えば、配列番号 3 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号 3 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる cDNA とは、配列番号 3 で示される配列からなる DNA と、約 60% 以上、好ましくは約 70% 以上、より好ましくは約 80% 以上、例えば 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約 90% 以上、例えば 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約 99% 以上の同一性を有する配列からなる DNA、若しくは、配列番号 3 で示される核酸配列に相補的な配列からなる DNA 又は RNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズできる DNA であって、これらの DNA によってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。あるいは、配列番号 3 で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる cDNA とは、配列番号 3 で示される配列中の 1 又は複数個、例えば 1～10 個、好ましくは数個、例えば 1～5 個、1～4 個、1～3 個、1～2 個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなる DNA であって、これらの DNA によってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。

[0097] 配列番号3で示される配列は、以下の配列である。

```
atgtctcaga gcaaccgga gctggtggtt gactttctct cctacaagct ttcccagaaa  
ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggg cccagaaggg  
actgaatcgg agatggagac cccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca  
gacagccccg cggatgaatg agccactggc cacagcagca gtttggatgc ccgggaggtg  
atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgtg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgcgg  
taccggcggg cattcagtga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat  
cagagctttg aacaggtagt gaatgaactc ttccgggatg gggtaaactg gggtcgcatt  
gtggcctttt tctccttcgg cggggcactg tgcgtggaaa gcgtagacaa ggagatgcag  
gtattggtga gtcggatcgc agcttggatg gccacttacc tgaatgacca cctagagcct  
tggatccagg agaacggcgg ctgggatact tttgtggaac tctatgggaa caatgcagca  
gccgagagcc gaaagggcca ggaacgcttc aaccgctggt tcctgacggg catgactgtg  
gccggcgtgg ttctgctggg ctactcttc agtcggaaat ga
```

[0098] CDKN1A遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号4で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号4で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号4で示される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号4で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNA又はRNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。あるいは、配列番号4で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号4で示される配列中の1又は複数個、例えば1～10個、好ましくは数個、例えば1～5個、1～4個、1～3個、1～2個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなるDNAで

あって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するもののことである。

[0099] 配列番号4で示される配列は、以下の配列である。

```
atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct tcctggccaa
caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcaggcg ccatgtcaga accggctggg
gatgtccgtc agaacccatg cggcagcaag gcctgccgcc gcctcttcgg cccagtggac
agcgagcagc tgagccgcga ctgtgatgcg ctaatggcgg gctgcatcca ggaggcccg
gagcgatgga acttcgactt tgtcaccgag acaccactgg agggtgactt cgcctgggag
cgtgtgcggg gccttggcct gcccaagctc taccttccca cggggccccc gcgaggccgg
gatgagttgg gaggaggcag gcggcctggc acctcacctg ctctgctgca ggggacagca
gaggaagacc atgtggacct gtcactgtct tgtacccttg tgcctcgctc aggggagcag
gctgaagggt ccccaggtgg acctggagac tctcagggtc gaaaacggcg gcagaccagc
atgacagatt tctaccactc caaacgccgg ctgatcttct ccaagaggaa gccctaa
```

[0100] p53遺伝子とは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号5で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号5で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号5で示される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号5で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、そのDNAによってコードされるタンパク質が、癌を抑制するもののことである。あるいは、配列番号5で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号5で示される配列中の1又は複数個、例えば1～10個、好ましくは数個、例えば1～5個、1～4個、1～3個、1～2個の塩基が欠失、置換若しくは付加さ

れた配列からなるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、癌を抑制するものである。

[0101] 配列番号5で示される配列は、以下の配列である。

```
atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg
gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga cccaggtcca
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccccgtagg cccctgcacc agcagctcct
acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccccgtg catcttctgt ccttccag
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt ttgccaact ggccaagacc
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgcccg gcacccgcgt ccgcgccatg
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgtgccc ccaccatgag
cgctgctcag atagcgatgg tctggcccc cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat
ttgcgtgtgg agtattttga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat
gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt
tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctacca tcatcacact ggaagactcc
agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcgtg tttgtgcctg tcctgggaga
gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctacca cgagctgccc
ccagggagca ctaagcgagc actgcccac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag
aaaccactgg atggagaata ttaccacctt cagatccgtg ggcgtgagcg cticgagatg
ttccgagagc tgaatgaggc ctiggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg
gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat
aaaaaactca tgttcaagac agaagggcct gactcagact ga
```

[0102] ここで、ストリンジェントな条件とは、当業者によって容易に決定されるハイブリダイゼーションの条件のことであり、一般的に核酸の塩基長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な実験条件である。一般に、塩基が長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、塩基が短くなると温度は低く

なる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点よりやや低い環境における再アニール能力に依存する。

[0103] 具体的には、例えば、低ストリンジェントな条件として、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄段階において、 $37^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ の温度条件下、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 溶液中で洗浄することなどが上げられる。また、高ストリンジェントな条件として、例えば、洗浄段階において、 65°C 、 $5\times\text{SSC}$ 及び 0.1% SDS 中で洗浄することなどが挙げられる。ストリンジェントな条件をより高くすることにより、相同性の高いポリヌクレオチドを得ることができる。

[0104] 6. 培養する工程

本実施形態に係る間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の前駆細胞を製造する方法は、上述した本実施形態に係る細胞分化度の調節方法で得られた細胞を培養する工程（培養工程）を含む。

[0105] 「前駆細胞」とは、増殖能を有する細胞から最終の分化形態である分化細胞への分化過程における細胞を意味する。

[0106] 細胞の培養条件は、細胞の種類やその状態に応じて当業者が適宜決定することができる。例えば、培養温度は約 $35^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ 、約 $36^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、又は約 $37^{\circ}\text{C}\sim 39^{\circ}\text{C}$ とすることができ、二酸化炭素濃度は例えば $5\%\text{CO}_2$ 、酸素濃度は例えば $20\%\text{O}_2$ とすることができる。静置培養であっても、振とう培養であってもよい。振とう培養の場合の振とう速度も特に限定されず、例えば、 $10\text{rpm}\sim 200\text{rpm}$ 、 $30\text{rpm}\sim 150\text{rpm}$ 等とすることができる。

[0107] 培地は、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、アスコルビン酸、TPOを含むイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）培地であってもよい。この場合、IMDM培地はさらにSCFを含んでいてもよく、さらにヘパリンを含んでいてもよい。さらに、ホルボールエステル

(例えば、ホルボールー１２ーミリストートー１３ーアセタート；PMA)を加えてもよい。

[0108] 細胞を培養する工程は、フィーダー細胞の存在下又は不在下で実施することができる。本明細書において、「フィーダー細胞」とは、増殖又は分化させようとしている標的細胞の培養に必要な環境を整えるために、標的細胞と共培養される細胞をいう。フィーダー細胞は、標的細胞と識別できる細胞である限り、同種由来の細胞であっても異種由来の細胞であってもよい。フィーダー細胞は、抗生物質やガンマ線により増殖しないよう処理した細胞であっても、処理されていない細胞であってもよい。

[0109] 培地は、血清又は血漿を含有していてもよく、あるいは無血清でもよい。血清を用いる場合は、ヒト血清が好ましい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、２ーメルカプトエタノール、チオールグリセロール、モノチオールグリセロール(MTG)、脂質、アミノ酸(例えばＬーグルタミン)、アスコルビン酸、ヘパリン、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、サイトカインなどの１つ以上の物質も含有してもよい。サイトカインとしては、例えば、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、トロンボポエチン(TPO)、各種TPO様作用物質、幹細胞因子(SCF)、エリスロポエチン(EPO)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、インターロイキン3(IL3)、ITS(インスリンートランスフェリンーセレナイト)サプリメント、ADAM(A Disintegrin And Metalloprotease)阻害剤などが例示される。

[0110] 7. 分化する工程

本実施形態に係る間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の分化細胞を製造する方法は、上述した本実施形態に係る細胞分化度の調節方法で得られた細胞を分化する工程(分化工程)を含む。

[0111] 「分化細胞」とは、増殖能を有する細胞からの分化過程における細胞、又はその最終の分化形態である細胞を意味する。

[0112] 分化する工程は、分化させる細胞の種類に応じた培養条件で培養することにより、実施することができ、上述した培養する工程についての説明を参照してよい。

[0113] 8. 細胞

本発明は、第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子を有する、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、若しくは骨髓球、又はこれらの前駆細胞若しくは分化細胞（以下、本発明の細胞）を提供する。

[0114] MYCファミリー遺伝子は、好ましくはc-MYCである。第1の外來性プロモーター及び第2の外來性プロモーターは、独立して、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、調節性プロモーターである。調節性プロモーターは、好ましくは薬剤反応性プロモーターであり、より好ましくは、テトラサイクリン反応性プロモーターである。第1の外來性プロモーターと第2の外來性プロモーターの種類は、同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一の種類のプロモーターである。同一の種類のプロモーターを用いることにより、MYCファミリー遺伝子とBMI1遺伝子を同期的に発現させることができ、また同期的に発現を抑制することができる。第1の外來性プロモーターと第2の外來性プロモーターは、好ましくは、同一の調節性プロモーター（例、薬剤反応性プロモーター）であり、より好ましくは共にテトラサイクリン反応性プロモーターである。第1の外來性プロモーターと第2の外來性プロモーターとは、それぞれ独立して、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子と作用可能に連結されていてもよいし、1つの外來性プロモーターに、MYCファミリー遺伝子とBMI1遺伝子とが作用可能に連結されていてもよい。この場合、MYCファミリー遺伝子とBMI1遺伝子とは、IRES等の介在配列を介して連結されることにより、1つの外來性プロ

モーターの制御下で、バイシストロニックな発現が可能となる。第1の外来性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、本発明の細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第1の外来性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれている。

[0115] 第1の外来性プロモーター及び／又は第2の外来性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン依存的な発現制御を可能とするため、本発明の細胞は、第3の外来性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有することが好ましい。第3の外来性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。第3の外来性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、本発明の細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第3の外来性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれている。

[0116] 本発明の細胞は、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球が増殖し得る条件下で培養した場合に、インビトロでこれらの細胞の増殖を促進し得る量のMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBMI1遺伝子を発現する。インビトロでこれらの細胞の増殖を促進し得る量のMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc）及びBMI1遺伝子とは、当該量のMYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を発現するこれらの細胞の増殖速度が、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を発現していないことを除いてはこれらの細胞と同様に作成した間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球

と比較して、有意に上昇するようなMYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子の量を意味する。

[0117] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞は、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子を更に有していてもよい。該細胞を第4の外來性プロモーターが作動する条件下で培養すると、BCL-XL遺伝子が発現し、本発明の細胞の増殖が更に促進されることが期待できる。第4の外來性プロモーターは、独立して、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、調節性プロモーターである。調節性プロモーターは、好ましくは薬剤反応性プロモーターであり、より好ましくは、テトラサイクリン反応性プロモーターである。第4の外來性プロモーターの種類は、第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターと同一であっても異なってもよいが、好ましくは、第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、同一の種類のプロモーターである。同一の種類のプロモーターを用いることにより、MYCファミリー遺伝子、BML1遺伝子及びBCL-XL遺伝子を同期的に発現させることができ、また同期的に発現を抑制することができる。第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、好ましくは、同一の調節性プロモーター（例、薬剤反応性プロモーター）であり、より好ましくは全てテトラサイクリン反応性プロモーターである。第4の外來性プロモーターは、第1及び第2の外來性プロモーターと独立して、BCL-XL遺伝子と作用可能に連結されていてもよいし、第1の外來性プロモーターにMYCファミリー遺伝子とBCL-XL遺伝子とが作用可能に連結されていてもよいし、第2の外來性プロモーターにBML1遺伝子とBCL-XL遺伝子とが作用可能に連結されていてもよいし、1つの外來性プロモーターに、MYCファミリー遺伝子、BML1遺伝子及びBCL-XL遺伝子が作用可能に連結されていてもよい。複数の遺伝子をRES等の介在配列を介して連結することにより、1つの外來性プロモーターの制御下で、バイシストロニックな発現が可能となる。第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、本発明の細胞内に

導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれている。

[0118] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞は、第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸（例、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸）をコードする核酸、及び／又は第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸を更に有していてもよい。該細胞を第5の外來性プロモーター、及び／又は第6の外來性プロモーターが作動する条件下で培養すると、CDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸、及び／又はp53遺伝子に対する発現抑制核酸が発現し、本発明の細胞の増殖が更に促進されることが期待できる。第5の外來性プロモーター及び第6の外來性プロモーターは、独立して、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。恒常的プロモーターは、好ましくは、H1プロモーター等のpolII系プロモーターである。第5の外來性プロモーターの種類は、第6の外來性プロモーターと同一であっても異なってもよい。第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、本発明の細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、本発明の細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよいが、好ましくは、本発明の細胞のゲノムに組み込まれている。

[0119] 一態様において、本発明の細胞は、
第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子、
第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子、及び
第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子

を有する、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、若しくは骨髄球、又はこれらの前駆細胞である。第1の外来性プロモーター及び／又は第2の外来性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外来性プロモーターと作用可能に連結された *rtTA* 遺伝子又は *tTA* 遺伝子を更に有していてもよい。

[0120] 一態様において、本発明の細胞は、

第1の外来性プロモーターと作用可能に連結された *MYC* ファミリー遺伝子、

第2の外来性プロモーターと作用可能に連結された *BM11* 遺伝子、

第5の外来性プロモーターと作用可能に連結された *CDKN1A* 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び

第6の外来性プロモーターと作用可能に連結された *p53* 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸

を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、若しくは骨髄球、又はこれらの前駆細胞である。第1の外来性プロモーター及び／又は第2の外来性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外来性プロモーターと作用可能に連結された *rtTA* 遺伝子又は *tTA* 遺伝子を更に有していてもよい。

[0121] 一態様において、本発明の細胞は、

第1の外来性プロモーターと作用可能に連結された *MYC* ファミリー遺伝子、

第2の外来性プロモーターと作用可能に連結された *BM11* 遺伝子、

第4の外来性プロモーターと作用可能に連結された *BCL-XL* 遺伝子

第5の外来性プロモーターと作用可能に連結された *CDKN1A* 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び

第6の外来性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸

を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、若しくは骨髄球、又はこれらの前駆細胞である。第1の外来性プロモーター及び／又は第2の外来性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外来性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有していてもよい。

[0122] 本発明の細胞は、上述した本発明の任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、若しくはリンパ球、又は高分化度を有する巨核球、若しくは骨髄球の分化度を調節する方法、又は間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髄球の前駆細胞を製造する方法により得ることができる。

[0123] また、本発明は、上記本発明の細胞を含む細胞集団（本発明の細胞集団という。）を提供する。該細胞集団は、上記本発明の細胞を豊富に含み、該細胞集団全体に含まれる本発明の細胞の割合は、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。このような本発明の細胞を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法を適用した細胞集団から、目的とする特定の分化度（例、高分化度、低分化度）を有する細胞（間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、若しくは骨髄球、又はこれらの前駆細胞）を、抽出することにより得ることができる。好ましい態様において、本発明の細胞集団は、特定の分化度（例、高分化度、低分化度）を有する本発明の細胞を豊富に含む。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞は間葉系幹細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞は血管内皮細胞であ

る)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞(該細胞は平滑筋細胞である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞(該細胞は神経堤細胞である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞(該細胞はリンパ球である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞(該細胞は巨核球である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞(該細胞は骨髄球である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。このように特定の分化段階(例、高分化度、低分化度)にある本発明の細胞を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法の方法を適用した細胞集団から、目的とする分化段階の細胞を、該分化段階の細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、セルソーター等で単離・抽出することにより得ることができる。

[0124] 本発明の細胞、及び本発明の細胞集団は、上述した本発明の任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、若しくはリンパ球、又は高分化度を有する巨核球、若しくは骨髄球の分化度を調節する方法、又は間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髄球の前駆細胞を製造する方法により得ることができる。

[0125] 9. 細胞調製物

また、本発明は、上記本発明の細胞集団を含む細胞調製物（本発明の細胞調製物という。）を提供する。本発明の細胞調製物は、上記本発明の細胞集団を、適切な生理的水溶液（例、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、液体培地）で懸濁することにより調整することができる。該生理的水溶液には、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、塩酸リドカイン、塩酸プロカイン等）、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等）、保存剤（例えば、安息香酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム等）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、エデト酸ナトリウム等）等を配合してもよい。該細胞調製物中には、細胞濃度が、例えば $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^{12}$ 細胞/mL となるように、上記本発明の細胞集団を懸濁する。

[0126] 細胞調製物中に含まれる本発明の細胞又は細胞集団の種類に応じ、該細胞の増殖に適したサイトカインの生み合わせを、該細胞調製物に添加してもよい。例えば、間葉系幹細胞を含む細胞調製物の場合、bFGFを該細胞調製物に添加することができる。血管内皮細胞を含む細胞調製物の場合、VEGFを該細胞調製物に添加することができる。平滑筋細胞を含む細胞調製物の場合、VEGFを該細胞調製物に添加することができる。神経堤細胞を含む細胞調製物の場合、SB-431542等のALK5阻害剤及びCHIR99021等のGSK3阻害剤を該細胞調製物に添加することができる。或いは、神経堤細胞を含む細胞調製物の場合、SB-431542等のALK5阻害剤、EGF及びFGF2を該細胞調製物に添加してもよい。リンパ球を含む細胞調製物の場合、IL-3を該細胞調製物に添加することができる。巨核球を含む細胞調製物の場合、TPO及びSCFを該細胞調製物に添加することができる。

[0127] 10. 細胞分化度調節剤

本実施形態に係る細胞分化度調節剤は、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含み、任意に、BCL-XL遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含み、或いはCDKN1A遺

伝子又は p 5 3 遺伝子の発現又はその発現産物の機能を抑制する分子を有効成分として含む。

[0128] 1 1. 医薬組成物

本実施形態に係る医薬組成物は、本発明の細胞分化度を調節する方法、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の前駆細胞又は分化細胞を製造する方法で得られた細胞を含む。

[0129] 1 2. 治療又は予防方法

本実施形態に係る治療又は予防方法は、本発明の細胞分化度を調節する方法、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の前駆細胞又は分化細胞を製造する方法で得られた細胞、又は該細胞を含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

[0130] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

実施例

[0131] 実施例 1 - 1 : 間葉系幹細胞

Fukutaら (Plos One, 2014, 9 (12) : e112291) の報告に従い、iPS細胞から、Matrigel coating培養皿上で、SB-431542、CHIR99021存在下で、培養7日で、Neural Crest Cell (NCC) を誘導した。その後、Fibronectin coating培養皿で、EGF、FGF2、SB-431542を含む培地に変更し、NCCの増幅をおこなった。さらに、Fibronectin coating培養皿で、10%FBS、FGF2を含む培地に変更し、MSCを誘導した。

MSCを誘導後、1ヶ月経過した9継代目の細胞に対して、以下に示すウイルスベクターのいずれかをそれぞれ感染させた。

・Control (感染なし、または空のウイルスベクター)

- ・ c-MYCのみ
- ・ c-MYC+BM11 (MB)
- ・ c-MYC+BM11+BCLXL (MBX)
- ・ c-MYC+BM11+BCLXL+shp53
- ・ c-MYC+BM11+BCLXL+shp53+shp21
- ・ shp53 (p53KD)
- ・ shp21 (p21KD)

iPS-MSCの基本培地は、alpha MEM+10%FCS+5ng/ml bFGFを用いた。

MYC、BM11、BCLXLの強制発現ベクターはdoxycyclineで発現を誘導するシステム(dox on system)を使用し、感染直後より培養液中にdoxycycline 1μg/mlを添加し、生細胞数をカウントした。結果を図1に示す。図1に示すように、Control(感染なし、または空のウイルスベクター)は徐々に増殖が止まった。p53KDでは、一過性の増殖が得られるが、同様に徐々に増殖が停止した。また、c-MYCのみの強制発現、および、p21KDではControl条件よりも早期に増殖がストップした。一方、MBを含む組み合わせ(c-MYC+BM11、c-MYC+BM11+BCLXL、c-MYC+BM11+BCLXL+shp53、c-MYC+BM11+BCLXL+shp53+shp21)では、感染後60日を越えても、指数関数的に増殖することが確認された。

[0132] また、間葉系幹細胞の代表的なマーカーである、CD90-FITC、CD73-PE、CD105-APCで染色し、フローサイトメーターにて解析した。結果を図2に示す。興味深いことに、CD90+/CD73+/CD105+の細胞集団の割合は、Control群では減少したが、MB及びMBX群では増加していた。Control群にはCD90+の細胞集団とCD90-の細胞集団が認められた。CD90は、間葉系幹細胞の代表的なマーカーで、間葉系幹細胞からの終末分化が進み、幹細胞性が失われるとともにCD90の発

現が失われる。これらの結果から、C n t r o l 群では、継代とともに幹細胞性が徐々に失われて終末分化が進んだ間葉系幹細胞（C D 9 0 -）が出現するが、MB及びMB X群では、幹細胞性が維持されて、より未分化な間葉系幹細胞（C D 9 0 +）が大部分を占めたことが示唆された。

[0133] また、9 継代目の分化細胞（C D 9 0 -）を含む細胞集団を、C D 9 0 抗体で染色後、C D 9 0 + 分画とC D 9 0 - 分画に分けて純化し、感染なしをC o n t r o l として、MB 感染後、両群にd o x y c y c l i n e 1 μ g / m L を加え培養し、感染14 及び21 日目にフローサイトメトリー解析に付した。結果を図3 に及び図5 示す。

感染21 日目にF A C S でC D 1 0 5、C D 9 0、C D 7 3 を解析したところ、C o n t r o l 群では、C D 9 0 + 純化群では、13 %がC D 9 0 + を保持したが、ほとんどがC D 9 0 - 分化細胞となっていた。また、C D 9 0 - 純化群では、ほとんどがC D 9 0 - 分化細胞であった。C D 9 0 + 分画はC D 9 0 + 分画とC D 9 0 - 分画を生じさせるが、C D 9 0 - 分画はC D 9 0 + 分画を生み出さないことから、C D 9 0 + 分画がヒエラルキーの上流に位置することが示唆された。一方、MB 群では、C D 9 0 + 純化群、C D 9 0 - 純化群、両群とも、ほとんどの細胞集団がC D 9 0 + を発現していた。c - M Y C + B M I 1 強制発現により、C D 9 0 + 分画からもC D 9 0 - 分画からもC D 9 0 + C D 7 3 + C D 1 0 5 + 分画が生み出されたことから、c - M Y C + B M I 1 により、終末分化が進んだ間葉系幹細胞（C D 9 0 -）が、より未分化な間葉系幹細胞（C D 9 0 +）に変換されたことが示された（間葉系幹細胞の前駆細胞への若返り、前駆細胞リプログラミング）。

[0134] また、D o x o f f にすることで、MB またはMB X の発現をオフにすると、増殖速度が緩やか（D o x o n の1 / 2 ~ 1 / 3 程度の速度）になり、徐々にC D 9 0 発現を失っていく（分化していく）ことを確認した（図4）。MB X の導入は、M S C をP a s s a g e 0 のあたりまで若返らせた。

[0135] 実施例1 - 2 : 軟骨細胞・骨芽細胞・脂肪細胞への分化誘導

[0136] 実施例 1-1 に準じて iPS 由来 MSC に MB 又は MBX を強制発現することにより樹立した増殖能を有する MSC (不老化 MSC) を脂肪細胞、骨芽細胞、及び軟骨細胞へ分化誘導し、各系列への分をヒト骨髄由来 MSC と比較した。脂肪細胞分化は、StemPro (商標) Adipogenesis Differentiation Kit gibco (cat: A1007001) で行い、HCS (High-content screening) LipidTOX (商標) Green neutral lipid stain (Invitrogen (Molecular Probes)) Cat: H34475 で染色することにより確認した。骨芽細胞分化は、StemPro (商標) Adipogenesis Differentiation Kit gibco (cat: A1007001) で行い、Alizarin Red S Staining Quantification Assay scien cell Research laboratories #8678 で染色することにより確認した。軟骨細胞分化は、StemPro (商標) Osteogenesis Differentiation Kit gibco (cat: A1007201) で行い、Alcian blue stain solution pH=2.5 (Sigma) cat: A3157 で染色することにより確認した。結果を図 6 に示す。

その結果、いずれの系列への分化も、ヒト骨髄由来 MSC と同等であったことから、増殖能を有する MSC は生体内 MSC と同等の分化能力を有することが示された。

[0137] 実施例 2 : 血管内皮細胞

Takayama Blood 2008, 111 (11) : 5298-5306 ; Takayama JEM 2010, 207 (13) : 2817-2830 の手法を用いて、10T1/2 細胞との共培養、20 ng/ml VEGF 存在下により、ヒト iPS 細胞から血管前駆細胞を誘導し、10 ~ 11 日目に CD34+ 血管内皮細胞前駆細胞を FACS Aria III でソートし、Dox-on c-MYC/Dox-on BMI1/Dox-on

n BCL-XLレンチウイルスベクターを感染させ、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline、 $100\text{ng}/\text{ml}$ VEGF存在下で培養を継続し、細胞数をカウントした。dox onではコントロール（ウイルス感染なし）と比較し、細胞増殖が有意に上昇した（図7）。また、dox onの状態、及び7日間dox offとして、成熟させた状態で、細胞表面マーカーVE-cadherinの免疫染色をおこなった。

その結果、dox offとした細胞は、よりVE-cadherinの発現が上昇し、血管内皮細胞へ分化していることが確認できた（図8～10）。

[0138] さらに、qPCRを用いて、ヒトiPS、imVEC-dox on、imVEC-dox off、HAEC（human aortic endothelial cell：ヒト動脈血管内皮細胞）、HUVEC（human umbilical vein endothelial cells：ヒト臍帯由来静脈内皮細胞）における血管内皮細胞の分化マーカーENG（CD105）、MCAM（CD146）、PECAM1の遺伝子発現を評価した。

その結果、ヒトimVECをdox offとして得られた細胞は、HAECやHUVECと同レベルで、血管内皮細胞の分化マーカーを発現していることが確認できた（図11）。

[0139] 実施例3：血管平滑筋細胞

Takayama Blood 2008, 111 (11) : 5298-5306; Takayama JEM 2010, 207 (13) : 2817-2830の手法を用いて、10T1/2細胞との共培養、 $20\text{ng}/\text{ml}$ VEGF存在下により、ヒトiPS細胞から血管前駆細胞を誘導し、10～11日目にCD34- / VEGFR<KDR>+ 血管平滑筋前駆細胞を、FACS Aria IIIでソートし、Dox-on c-MYC / Dox-on BMI1 / Dox-on BCL-XL レンチウイルスベクターを感染させ、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline存在下で培養を継続し、細胞数

をカウントした。dox onではコントロール（ウイルス感染なし）と比較し、細胞増殖が有意に上昇した（図12）。

また、培養26日目（dox onの前駆細胞段階）、および、22日目から1週間dox offとした細胞（day 29）を平滑筋の分化マーカーである、Calponin, α SMAの免疫染色を行った。

その結果、dox offの細胞では、血管平滑筋分化マーカーの発現が増強していることが確認できた（図13）。

[0140] MBX導入により増殖性を向上させた不老化血管平滑筋細胞をdox off（MBX off）として、3日目にPDGFR2-APC抗体とインキュベーションした後FACS Canto IIで解析し、PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞と、PDGFR2-分化血管平滑筋細胞とにそれぞれsortingして純化した（図14）。その後再び $1\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclineを加えた群、そのままdox offを継続した群に分けて、形態観察、細胞数カウント、FACSによる細胞表面マーカー（CD140b、KDR、及びCD34）の確認を行った。すなわち、以下の計4グループについて試験を行った。

I) PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞+dox on

II) PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞 dox off

III) PDGFR2-分化血管平滑筋細胞+dox on

IV) PDGFR2-分化血管平滑筋細胞 dox off

[0141] sortingして5日後のグループI)～IV)の形態観察の結果を図15に、細胞数をカウントした結果を図16に、細胞表面マーカーの発現を確認した結果を図17-1～17-3に示した。図16、及び図17-1～17-3の結果から、dox onにしたグループI) PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞+dox on、及びグループIII) PDGFR2-分化血管平滑筋細胞+dox onのどちらも、dox offにしたグループII) PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞 dox off、及びグループIV) PDGFR2-分化血管平滑筋細胞 dox offと比べて、表面マーカーで

あるCD140b、KDR、及びCD34の発現が低く抑えられ、また、細胞数の増殖速度が増大したことから、細胞が未分化血管平滑筋細胞の状態に戻ったことが示された。この結果から、PDGFR2-分化血管平滑筋細胞にMBXを強制発現すると、増殖能を有する未分化血管平滑筋細胞（血管平滑筋細胞前駆細胞、PDGFR2+）へ戻ることが示唆された（前駆細胞リプログラミング）。一方、MBXを発現する未分化血管平滑筋細胞（血管平滑筋細胞前駆細胞、PDGFR2+）のMBX発現を停止すると、成熟した血管平滑筋細胞（PDGFR2-）へと分化することが示唆された。

[0142] また、sortingした後、28日間dox onの状態 で培養し、29日目から1週間dox offとした、PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞及びPDGFR2-分化血管平滑筋細胞を、平滑筋の分化マーカーである、Calponin、及び α SMAで免疫染色を行った。

その結果、PDGFR2+未分化血管平滑筋細胞及びPDGFR2-分化血管平滑筋細胞のどちらにおいても、平滑筋分化マーカーの発現が増強していることが確認できた（図18）。MBXを強制発現した（前駆細胞リプログラミングした）PDGFR2-分化血管平滑筋細胞においても、平滑筋分化マーカーの発現が増強したことから、前駆細胞リプログラミングした後も、良好な分化能力を保持していることが示唆された。

[0143] 実施例4：神経堤細胞

Fukutaら（PlosOne, 2014, 9(12):e112291）の報告に従い、iPS細胞から、Matrigel coating培養皿上で、SB-431542、CHIR99021存在下で、培養7日で、神経堤細胞（Neural Crest Cell、NCC）を誘導した。その後、EGF、FGF2、SB-431542を添加したCDMi培地（F-12w, BSA, CD concentrated lipid, Apotransferrin, 1-Thioglycerol, 及びP/S and Insulinを添加したIMDM培地を基に、CDMi培地を作製した）

からなるNCC培地に変更し、Fibronectin coating培養皿上で、NCCの増幅を行った。

培養したNCCに、c-MYC+BM11 (MB) レンチウイルスベクター又はc-MYC+BM11+BCLXL (MBX) レンチウイルスベクターを感染させ、1 μ g/ml doxycycline存在下で培養を継続し、形態観察、細胞数カウント、及びFACSによる表面マーカー (CD271) の確認を行った (図19~23)。

[0144] sortingして10日後のグループControl群 (感染なし、または空のウイルスベクター)、c-MYC+BM11 (MB) レンチウイルスベクター、又はc-MYC+BM11+BCLXL (MBX) レンチウイルスベクターを感染させたNCCの形態観察の結果を図19に示した。また、図20に示すように、Control群は徐々に細胞の増殖が止まった一方で、c-MYC+BM11 (MB) レンチウイルスベクター又はc-MYC+BM11+BCLXL (MBX) レンチウイルスベクターを感染させたNCCでは、指数関数的に細胞が増殖することが確認された。

[0145] また、神経堤細胞の細胞表面マーカーであるCD271の発現を、フローサイトメーターにて解析した。結果を図F及びGに示す。神経堤細胞の終末分化が進み、幹細胞性が失われるとともにCD271の発現が失われる。Control群では継代数が上がるにつれてCD271の発現が減少した一方で (図21)、MB及びMBX群では発現が回復した (図22)。これらの結果から、Control群では、継代とともに幹細胞性が徐々に失われて終末分化が進むが、MB及びMBX群では、幹細胞性が維持されて、未分化NCCを維持することが示唆された。

[0146] さらにまた、培養皿のFibronectinによるコーティングの有無は、MB及びMBX群の細胞数、及びCD271の発現に影響をほとんど及ぼさないことが確認された (図23)。

[0147] 実施例5：リンパ球

6wellプレートのwellに0.1% gelatin 1ml/wellを入れ、30分間37℃でインキュベートした。Gelatinを取り除き、不老化血管内皮細胞を $2\sim 3\times 10^5$ cell/wellで、基本培地 (IMDM+15% FBS+ $10\mu\text{g/ml}$ human insulin, $5\mu\text{g/ml}$ transferrin+ 5ng/ml sodium selenite+ 2mM L-glutamine+ 0.45mM α -monothioglycerol+ $50\mu\text{l/ml}$ ascorbic acid+ 20ng/ml VEGF) で播種した。本試験で使用した不死化血管内皮細胞は、実施例2に従い、MBX導入で増殖性を向上させた血管内皮細胞を、dox offで7日間培養して得られた成熟させ、放射線照射して増殖を止めた血管内皮細胞である。37℃、CO₂ 5.0%で培養した。翌日に培地を除去し、iPS由来のヒト造血幹細胞 1×10^5 cell/wellをiPS細胞由来造血前駆細胞用基本培地 (IMDM+15% FBS+ $10\mu\text{g/ml}$ human insulin+ $5.5\mu\text{g/ml}$ transferrin+ 5ng/ml sodium selenite+ 2mM L-glutamine+ 0.45mM α -monothioglycerol+ $50\mu\text{l/ml}$ ascorbic acid+ 50ng/ml human Flt3L+ 50ng/ml human SCF+ 20ng/ml IL-7+ 20ng/ml IL-15) で播種した。同日に、ドキシサイクリン誘導性のc-MYC+BM11+BCLXL (MBX) ウイルスベクターを加え、さらにDoxycyclineを $1\mu\text{g/ml}$ で添加した。サイトカイン濃度はhFlt3L 50ng/ml +hSCF 50ng/ml +IL-7 20ng/ml +IL-15 20ng/ml を基本とし、IL-3添加群では、さらに最初の2週間のみIL-3を 20ng/ml で投与し、全て37℃、CO₂ 5.0%で培養した。以後2~3日毎に培地を半分交換しながら培養した。また、CD45-BV421、CD56-FITC、及びCD19-PC7で染色し、CD45+/CD56+の細胞及びCD45+/CD19+の細胞についてFACS Cantol1にて解析した (図

24～27)。CD45-BV421及びCD56-FITCはナチュラルキラー細胞の細胞表面マーカーであり、CD45-BV421及びCD19-PC7はB細胞の細胞表面マーカーである。

[0148] 図24に示すように、全体の細胞数、及びCD45+/CD56+の細胞数は、MBX(+) + IL-3群では2カ月以上にわたって指数関数的に増加したが、MBX(-)群(感染なし、または空のウイルスベクター)では培養50日目以降、徐々に増加が止まった。MBX(+)群は、CD45+/CD56+の細胞の増殖が乏しかったので、38日で培養を中止した。

また、図25に示すように、MBX(-)群ではCD45+/CD56+の細胞集団の割合が培養30日目で89.9%、day64で32.9%と減少し、一方で、MBX(+) + IL-3群ではday30で55.9%、day66で69.2%と、66日を過ぎても50%以上の高い割合で細胞集団が確認された。

よって、MBX(+) + IL-3群では、高い増殖能を有するCD45+/CD56+の細胞を得ることができ、不老化ナチュラルキラー細胞を高効率に多く作製することに成功した。

[0149] また、図26及び27に示すように、CD45+/CD19+の細胞集団も出現し、CD45+/CD19+の細胞数は、MBX(+) + IL-3群では2カ月以上にわたって指数関数的に増加したが、MBX(-)群(感染なし、または空のウイルスベクター)では培養50日目以降、徐々に増加が止まった。MBX(+)群は、CD45+/CD19+の細胞の増殖が乏しかったので、38日で培養を中止した。

よって、MBX(+) + IL-3群では、高い増殖能を有するCD45+/CD19+の細胞を得ることができ、不老化B細胞を高効率に多く作製することに成功した。

[0150] 以上の結果から、c-MYC、BMI1、及びBCLXL(MBX)を強制発現し、IL-3を添加して培養することで、不老化ナチュラルキラー細胞や不老化B細胞等の、不老化リンパ球細胞を得ることができた。

[0151] 実施例 6 : 骨髓球・巨核球

すでに MBX 導入により増殖性を向上させたヒト iPS 細胞から誘導した巨核球、骨髓球で実験を行った。培養には基礎培地として IMDM+ を用いた。さらに巨核球は、 50 ng/ml SCF、 50 ng/mL TPO で、骨髓球は、M-CSF 50 ng/mL 、GM-CSF 50 ng/mL 、G-CSF 25 ng/mL 、IL-3 25 ng/mL 、SCF 25 ng/mL 、TPO 5 ng/mL でそれぞれ培養を行った。

[0152] 巨核球

dox off (MBX off) として、3 日目に FACS aria III で CD41+CD42b- 未分化巨核球と、CD41+CD42b+ 分化巨核球をそれぞれ、sorting して純化した後、再び $1 \mu\text{g/ml}$ Doxycycline を加えた群、そのまま dox off を継続した群に分けて、細胞数カウント、FACS による表面マーカーの確認を行った。すなわち、以下の計 4 グループについて試験を行った。

I) CD41+CD42b- 未分化巨核球 + dox on

II) CD41+CD42b- 未分化巨核球 dox off

III) CD41+CD42b+ 分化巨核球 + dox on

IV) CD41+CD42b+ 分化巨核球 dox off

[0153] 結果を図 28 上に示す。グループ I) CD41+CD42b- 未分化巨核球 + dox on、グループ III) CD41+CD42b+ 分化巨核球 + dox on のどちらも、doxycycline+ 群では、細胞が指数関数的に増殖し、また全ての細胞が、CD41+CD42b- 未分化巨核球の状態に戻った。一方、dox off にしたグループ II) CD41+CD42b- 未分化巨核球 dox off、グループ IV) CD41+CD42b+ 分化巨核球 dox off では、細胞増殖が停止し、CD41+CD42b+ 分化巨核球となった。この結果から、分化巨核球 (CD41+CD42b+) に MBX を強制発現すると、増殖能を有する未分化巨核球 (巨核球前駆細胞、CD41+CD42b-) へ戻ることが示唆された (前駆細胞リプログラミング

グ)。一方、MBXを発現する未分化巨核球（巨核球前駆細胞、CD41+CD42b-）のMBX発現を停止すると、増殖能を失い、成熟した巨核球（CD41+CD42b+）へと分化することが示唆された。

[0154] 骨髓球

dox off (MBX off) として、3日目にFACS aria IIIでCD14+CD11b-未分化マクロファージと、CD14+CD11b+分化マクロファージをそれぞれ、sortingして純化した後、再び1μg/ml doxycyclineを加えた群、そのままdox offを継続した群に分けて、細胞数カウント、FACSによる表面マーカーの確認を行った。すなわち、以下の計4グループについて試験を行った。

- I) CD14+CD11b-未分化マクロファージ+dox on
- II) CD14+CD11b-未分化マクロファージdox off
- III) CD14+CD11b+分化マクロファージ+dox on
- IV) CD14+CD11b+分化マクロファージdox off

[0155] 結果を図28下に示す。グループI) CD14+CD11b-未分化マクロファージ+dox on、グループIII) CD14+CD11b+分化マクロファージ+dox onのどちらも、doxycycline+群では、細胞が指数関数的に増殖し、また全ての細胞が、CD14+CD11b-未分化マクロファージの状態に戻った。

一方、dox offにしたグループII) CD14+CD11b-未分化マクロファージdox off、グループIV) CD14+CD11b+分化マクロファージdox offでは、細胞増殖が停止し、CD14+CD11b+分化マクロファージとなった。この結果から、分化マクロファージ（CD14+CD11b+）にMBXを強制発現すると、増殖能を有する未分化マクロファージ（CD14+CD11b-）へ戻ることが示唆された（前駆細胞リプログラミング）。一方、MBXを発現する未分化マクロファージ（CD14+CD11b-）のMBX発現を停止すると、増殖能を失い、成熟したマクロファージ（CD14+CD11b+）へと分化することが示唆された。

[0156] 実施例 7-1：不老化血管内皮細胞との共培養

Notch と、Notch リガンド (Delta-like 4 (以下、DLL4) や Jagged 1 等) との相互作用によって伝達される notch シグナルが、細胞の分化に必要であることが知られている。

また、dox on にした不老化血管内皮細胞、dox off にした不老化血管内皮細胞、ヒト iPS 細胞、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、及びヒト臍帯血内皮細胞 (HUVEC) に対し PCA (主成分分析) を行った結果、dox off にした不老化血管内皮細胞の主成分は、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) 及びヒト臍帯血内皮細胞 (HUVEC) の主成分と類似していることが分かった (図 29)。さらに、dox off にした不老化血管内皮細胞では、dox on にした不老化血管内皮細胞、ヒト iPS 細胞、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、及びヒト臍帯血内皮細胞 (HUVEC) と比べて、DLL4 及び Jagged 1 が強く発現していることが分かった (図 30)。

そこで、造血幹細胞又は造血前駆細胞からリンパ球への分化に、不老化血管内皮細胞が与える影響を調べた。

[0157] 実施例 7-2：不老化血管内皮細胞と、CD34 陽性臍帯血細胞との共培養

本試験で使用した不老化血管内皮細胞は、実施例 2 に従い、MBX 導入で増殖性を向上させた血管内皮細胞を、dox off で 7 日間培養して得られた成熟させ、放射線照射して増殖を止めた血管内皮細胞である。

6 well プレートの well に 0.1% gelatin 1 ml/well を入れ、30 分間 37℃ でインキュベートした。Gelatin を取り除き、不老化血管内皮細胞を $2-3 \times 10^5$ cell/well で、基本培地で播種し、37℃、CO₂ 5.0% で培養した。翌日、培地を除去し、CD34 陽性臍帯血細胞 5×10^3 cell/well を CD34 陽性臍帯血細胞由来造血前駆細胞用基本培地 (X-VIVO10 + 10% BSA) で播種した。また不老化血管内皮細胞を播種していない well (コントロール、feeder free) にも CD34 陽性臍帯血細胞 5×10^3 c

e l l / w e l l を C D 3 4 陽性臍帯血細胞由来造血前駆細胞用基本培地で播種した。サイトカインの条件は C y t o k i n e 1 ~ 4 の 4 種類を用意し、全て 3 7 ° C 、 C O ₂ 5 . 0 % で培養した。以後 2 - 3 日毎に培地を半分交換しながら培養し、培養 2 4 日目にナチュラルキラー細胞の細胞表面マーカーである C D 4 5 - B V 4 2 1 及び C D 5 6 - F I T C で染色し、C D 4 5 + / C D 5 6 + の細胞について F A C S C a n t o 1 1 で解析した（図 3 1 ~ 3 2）。C y t o k i n e 1 ~ 4 の条件を以下に示す。

・ C y t o k i n e 1 :

X - V I V O 1 0 + 1 0 % B S A + 5 0 n g / m l h u m a n F l t 3 + 5 0 n g / m l h u m a n S C F + 2 0 n g / m l I L - 7 + 2 0 n g / m l I L - 1 5

・ C y t o k i n e 2 :

X - V I V O 1 0 + 1 0 % B S A + 5 0 n g / m l h u m a n F l t 3 + 5 0 n g / m l h u m a n S C F + 2 0 n g / m l I L - 7 + 2 0 n g / m l I L - 1 5 + 2 0 n g / m l I L - 2 + 5 0 n g / m l T P O

・ C y t o k i n e 3 :

X - V I V O 1 0 + 1 0 % B S A + 5 0 n g / m l h u m a n F l t 3 + 5 0 n g / m l h u m a n S C F + 2 0 n g / m l I L - 7 + 2 0 n g / m l I L - 1 5 + 2 0 n g / m l I L - 2 + 5 0 n g / m l T P O + 1 0 p g / m l G M - C S F + 2 5 0 p g / m l G - C S F + 5 0 p g / m l I L - 6

・ C y t o k i n e 4 :

d a y 0 - 9 ; X - V I V O 1 0 + 1 0 % B S A + 5 0 n g / m l h u m a n F l t 3 + 5 0 n g / m l h u m a n S C F + 2 0 n g / m l I L - 7 + 5 0 n g / m l T P O + 1 0 p g / m l G M - C S F + 2 5 0 p g / m l G - C S F + 5 0 p g / m l I L - 6

day 9-14; X-VIVO10+10% BSA+50 ng/ml human Flt3+50 ng/ml human SCF+20 ng/ml IL-7+20 ng/ml IL-15+10 pg/ml GM-CSF+250 pg/ml G-CSF+50 pg/ml IL-6
 day 14-; X-VIVO10+10% BSA+50 ng/ml human SCF+20 ng/ml IL-7+20 ng/ml IL-15+20 ng/ml IL-2+10 pg/ml GM-CSF+250 pg/ml G-CSF+50 pg/ml IL-6

[0158] 図31に示すように、Cytokine 1~4の全ての条件で、CD45+/CD56+の細胞集団が出現し、また、不老化血管内皮細胞と共培養しなかった場合 (feeder free) よりも、不老化血管内皮細胞と共培養した場合 (im EC) の方が、CD45+/CD56+の細胞集団の割合が高かった。

また、図32に示すように、細胞の絶対数に注目しても、同じサイトカイン条件で培養した細胞同士を比べると (例えば、im EC cytokine 3とfeeder free cytokine 2)、不老化血管内皮細胞と共培養した方が、CD45+/CD56+細胞の数が多かった。

以上の結果から、不老化血管内皮細胞と一緒に共培養することで、造血幹細胞又は造血前駆細胞のナチュラルキラー細胞への分化を促進できることが分かった。また、ナチュラルキラー細胞へ分化する前の中間体であるリンパ球前駆細胞への分化を促進できることが分かった。

[0159] 実施例7-3: 不老化血管内皮細胞又は遺伝子組換え型DLL4と、iPS細胞由来ヒト造血幹細胞との共培養

本試験で使用した不老化血管内皮細胞は、実施例2に従い、MBX導入で増殖性を向上させた血管内皮細胞を、dox offで7日間培養して得られた成熟させ、放射線照射して増殖を止めた血管内皮細胞である。

6wellプレートのwellに0.1% gelatin 1ml/wellを入れ、30分間37℃でインキュベートした。Gelatinを取り

除き、不老化血管内皮細胞を $2 \sim 3 \times 10^5$ cell/well で、基本培地 (IMDM + 15% FBS + $10 \mu\text{g/ml}$ human insulin + $5.5 \mu\text{g/ml}$ transferrin + 5 ng/ml sodium selenite + 2 mM L-glutamine + 0.45 mM α -monothioglycerol + $50 \mu\text{l/ml}$ ascorbic acid + 20 ng/ml VEGF) で播種し、 37°C 、 CO_2 5.0% で培養した。また別wellで遺伝子組換え型DLL4を播種し、 4°C で冷蔵した。翌日、培地を除去し、iPS由来のヒト造血幹細胞 8.4×10^4 cell/well をiPS細胞由来造血前駆細胞用基本培地 (IMDM + 15% FBS + $10 \mu\text{g/ml}$ human insulin + $5.5 \mu\text{g/ml}$ transferrin + 5 ng/ml sodium selenite + 2 mM L-glutamine + 0.45 mM α -monothioglycerol + $50 \mu\text{l/ml}$ ascorbic acid + 10 ng/ml human Flt3L + 50 ng/ml human SCF + 5 ng/ml IL-7 + 30 ng/ml TPO) で播種した。ドキシサイクリン誘導性のc-MYC + BMI1 + BCLXL (MBX) ウイルスベクターを加え、さらにDoxycyclineを $1 \mu\text{g/ml}$ で添加し、全て 37°C 、 CO_2 5.0% で培養した。以後2～3日毎に培地を半分交換しながら培養した。その後、B細胞の細胞表面マーカーであるCD45-BV421及びCD19-PC7で染色し、CD45+/CD19+の細胞についてFACS Canto IIで解析した (図33)。

[0160] 図33に示すように、遺伝子組換え型DLL4と共培養した場合よりも、不老化血管内皮細胞と共培養した場合 (im EC) の方が、CD45+/CD19+の細胞集団の割合及び細胞の絶対数が大きかった。よって、不老化血管内皮細胞は、DLL4以外にも、Jagged 1等の他のNotch リガンドも高発現している可能性が考えられた。

以上の結果から、遺伝子組換え型DLL4と共培養するよりも、不老化血管内皮細胞と一緒に共培養する方が、造血幹細胞又は造血前駆細胞のB細胞等

のリンパ球系細胞への分化をさらに促進できることが分かった。また、B細胞へ分化する前の中間体であるリンパ球前駆細胞への分化をさらに促進できることが分かった。

[0161] 実施例7-4: IL-3を投与した、不老化血管内皮細胞と、iPS細胞由来ヒト造血幹細胞との共培養

本試験で使用した不老化血管内皮細胞は、実施例2に従い、MBX導入で増殖性を向上させた血管内皮細胞を、dox offで7日間培養して得られた成熟させ、放射線照射して増殖を止めた血管内皮細胞である。

6wellプレートのwellに0.1% gelatin 1ml/wellを入れ、30分間37℃でインキュベートした。Gelatinを取り除き、不老化血管内皮細胞を $2 \sim 3 \times 10^5$ cell/wellで、基本培地 (IMDM+15% FBS+10 μ g/ml human insulin+5.5 μ g/ml transferrin+5ng/ml sodium selenite+2mM L-glutamine+0.45mM α -monothioglycerol+50 μ l/ml ascorbic acid+20ng/ml VEGF) で播種し、37℃、CO₂ 5.0%で培養した。翌日、培地を除去し、iPS由来のヒト造血幹細胞 8.4×10^4 cell/wellをiPS細胞由来造血前駆細胞用基本培地 (IMDM+15% FBS+10 μ g/ml human insulin+5.5 μ g/ml transferrin+5ng/ml sodium selenite+2mM L-glutamine+0.45mM α -monothioglycerol+50 μ l/ml ascorbic acid+50ng/ml human Flt3L+50ng/ml human SCF+20ng/ml IL-7+20ng/ml IL-15) で播種した。ドキシサイクリン誘導性のc-MYC+BM11+BCLXL (MBX) ウイルスペクターを加え、さらにDoxycyclineを1 μ g/mlで添加し、全て37℃、CO₂ 5.0%で培養した。最初の1週間のみIL-3を20ng/mlで投与した。以後2~3日毎に培地を半分交換しながら

ら培養した。その後、CD45-BV421、CD56-FITC、及びCD19-PC7で染色し、CD45+/CD56+の細胞及びCD45+/CD19+の細胞についてFACS Canto IIで解析した(図34)。CD45-BV421及びCD56-FITCはナチュラルキラー細胞の細胞表面マーカーであり、CD45-BV421及びCD19-PC7はB細胞の細胞表面マーカーである。培養に用いた各培地の組成は以下に示す。

[0162] 図34に示すように、不老化血管内皮細胞と共培養しなかった場合(feder free)よりも、不老化血管内皮細胞と共培養した場合(im EC)の方が、CD45+/CD56+の細胞集団及びCD45+/CD19+の細胞集団の割合が高かった。

以上の結果から、不老化血管内皮細胞と一緒に共培養することで、造血幹細胞又は造血前駆細胞のナチュラルキラー細胞又はB細胞への分化を促進できることが分かった。また、ナチュラルキラー細胞又はB細胞へ分化する前の中間体であるリンパ球前駆細胞への分化を促進できることが分かった。

請求の範囲

- [請求項1] (i) 任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに
- (ii) 高分化度を有する巨核球、及び骨髓球
- からなる群から選択される細胞において、
- MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、
- 細胞分化度の調節方法。
- [請求項2] 前記細胞が、任意の分化度を有する間葉系幹細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現しない間葉系幹細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現する間葉系幹細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記細胞が、任意の分化度を有する血管内皮細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 前記細胞が、任意の分化度を有する平滑筋細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項7] 前記細胞が、任意の分化度を有する血管平滑筋細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項8] 前記細胞が、CD140b、KDR、又はCD34の細胞表面マーカーを発現する血管平滑筋細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項9] 前記細胞が、任意の分化度を有する神経堤細胞である、請求項1に記載の方法。
- [請求項10] 前記細胞が、任意の分化度を有するリンパ球である、請求項1に記載の方法。

- [請求項11] 前記細胞が、CD41及びCD42bの細胞表面マーカーを発現する巨核球である、請求項1に記載の方法。
- [請求項12] 前記細胞が、CD14及びCD11bの細胞表面マーカーを発現する骨髓球である、請求項1に記載の方法。
- [請求項13] MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項14] BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項15] BCL-XL遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項16] CDKN1A遺伝子及びP53遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項17] 請求項1に記載の方法で得られた細胞を培養する工程を含む、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の前駆細胞の製造方法。
- [請求項18] 請求項1に記載の方法で得られた細胞を分化する工程を含む、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、リンパ球、巨核球、又は骨髓球の分化細胞の製造方法。
- [請求項19] 請求項1～18のいずれか1項に記載の方法で得られた細胞。
- [請求項20] 請求項1～18のいずれか1項に記載の方法で得られた細胞を含む、医薬組成物。
- [請求項21] 請求項1～18のいずれか1項に記載の方法で得られた細胞を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療又は予防方法。
- [請求項22] MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含む、

(i) 任意の分化度を有する間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、神経堤細胞、及びリンパ球、並びに

(i i) 高分化度を有する巨核球、及び骨髓球
からなる群から選択される細胞用の、細胞分化調節剤。

- [請求項23] 任意の分化度を有する間葉系幹細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する間葉系幹細胞の製造方法。
- [請求項24] 任意の分化度を有する間葉系幹細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現しない間葉系幹細胞である、請求項23に記載の製造方法。
- [請求項25] 任意の分化度を有する間葉系幹細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現する間葉系幹細胞である、請求項23に記載の製造方法。
- [請求項26] 増殖能を有する間葉系幹細胞が、CD90の細胞表面マーカーを発現する、請求項23～25のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項27] 任意の分化度を有する血管内皮細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する血管内皮細胞の製造方法。
- [請求項28] 任意の分化度を有する平滑筋細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する平滑筋細胞の製造方法。
- [請求項29] 任意の分化度を有する平滑筋細胞が、血管平滑筋細胞である、請求項28に記載の製造方法。
- [請求項30] 血管平滑筋細胞が、CD140b、KDR、又はCD34の細胞表面マーカーを発現する血管平滑筋細胞である、請求項29に記載の製造方法。

- [請求項31] 任意の分化度を有する神経堤細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する神経堤細胞の製造方法。
- [請求項32] 任意の分化度を有するリンパ球において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有するリンパ球の製造方法。
- [請求項33] CD41及びCD42bの細胞表面マーカーを発現する巨核球において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有する巨核球の製造方法。
- [請求項34] CD14及びCD11bの細胞表面マーカーを発現するマクロファージにおいて、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含む、増殖能を有するマクロファージの製造方法。
- [請求項35] 不老化血管内皮細胞、及び、iPS細胞、ES細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞を共培養する工程を含む、iPS細胞、ES細胞、造血幹細胞又は造血前駆細胞の、リンパ球細胞又はリンパ球前駆細胞への分化を促進する方法。
- [請求項36] リンパ球細胞が、CD45及びCD56、又は、CD19及びCD45の細胞表面マーカーを発現する、請求項35に記載の方法。
- [請求項37] リンパ球細胞が、ナチュラルキラー細胞又はB細胞である、請求項35又は36に記載の方法。
- [請求項38] 造血幹細胞又は造血前駆細胞が、臍帯血又はiPS細胞由来である、請求項35又は36に記載の方法。
- [請求項39] 不老化血管内皮細胞がNotchリガンドを発現している、請求項35又は36に記載の方法。
- [請求項40] NotchリガンドがDLL4及び／又はJagged1である、請求項39に記載の方法。