

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6461787号
(P6461787)

(45) 発行日 平成31年1月30日(2019.1.30)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
請求項の数 28 (全 31 頁)		

(21) 出願番号	特願2015-511329 (P2015-511329)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成26年4月14日 (2014.4.14)		国立大学法人京都大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/061106		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(87) 国際公開番号	W02014/168264	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成26年10月16日 (2014.10.16)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成29年4月14日 (2017.4.14)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	特願2013-84034 (P2013-84034)		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成25年4月12日 (2013.4.12)	(74) 代理人	100169579
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 村林 望
		(72) 発明者	長船 健二
			京都府京都市左京区吉田本町36番地1
			国立大学法人京都大学内
		(72) 発明者	後藤 慎平
			京都府京都市左京区吉田本町36番地1
			国立大学法人京都大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺胞上皮前駆細胞の誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト多能性幹細胞からヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を製造する方法であって、次の(1)~(4)の工程を含む、前記方法；

(1) ヒト多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 阻害剤を含む培養液中で6日間、培養する工程、

(2) (1)の工程で得られた細胞を、BMP阻害剤及びTGF 阻害剤を含む培養液中で4日間、培養する工程、

(3) (2)の工程で得られた細胞を、BMP4、レチノイン酸及びGSK3 阻害剤を含む培養液中で4日間、培養する工程、及び、

(4) 工程(3)の後に、カルボキシペプチダーゼM(CPM)が陽性であることを指標としてヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を抽出する工程。

【請求項2】

前記GSK3 阻害剤がCHIR99021であり、前記BMP阻害剤がNogginであり、且つ前記TGF 阻害剤がSB431542である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記工程(1)において、さらにROCK阻害剤及び/又はHDAC阻害剤を培養液に添加してヒト多能性幹細胞を培養する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記ROCK阻害剤がY-27632であり、及び/又は前記HDAC阻害剤が酪酸ナトリウムである、

請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記工程(4)の後に、ヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を、さらに3次元培養する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

前記3次元培養期間が10~12日間である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記3次元培養がヒト肺繊維芽細胞及び/又はヒト胎児肺繊維芽細胞との共培養である、請求項 5 又は 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記3次元培養がヒト胎児肺繊維芽細胞との共培養である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記3次元培養が、ステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤及びKGFを含む培養液で行われる、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

前記ステロイド剤がデキサメタゾンであり、前記cAMP誘導体が8Br-cAMPであり、且つ前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がIBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthine)である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

ヒト多能性幹細胞からヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を製造する方法であつて、次の(1)~(6)の工程を含む、前記方法；

(1) ヒト多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 阻害剤を含む培養液中で6日間、培養する工程、

(2) (1)の工程で得られた細胞を、BMP阻害剤及びTGF 阻害剤を含む培養液中で4日間、培養する工程、

(3) (2)の工程で得られた細胞を、BMP4、レチノイン酸及びGSK3 阻害剤を含む培養液中で4日間、培養する工程、

(4) (3)の工程で得られた細胞を、FGF10を含む培養液中で7日間、培養する工程、

(5) (4)の工程で得られた細胞を、ステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤及びKGFを含む培養液中で4日間、培養する工程、及び、

(6) 工程(5)の後に、カルボキシペプチダーゼM(CPM)が陽性であることを指標としてヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を抽出する工程。

【請求項 12】

前記GSK3 阻害剤がCHIR99021であり、前記BMP阻害剤がNogginであり、前記TGF 阻害剤がSB431542であり、前記ステロイド剤がデキサメタゾンであり、前記cAMP誘導体が8Br-cAMPであり、且つ前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がIBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthine)である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記工程(1)において、さらにROCK阻害剤及び/又はHDAC阻害剤を培養液に添加してヒト多能性幹細胞を培養する、請求項 11 又は 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記ROCK阻害剤がY-27632であり、及び/又は前記HDAC阻害剤が酪酸ナトリウムである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

アクチビンA、GSK3 阻害剤、BMP阻害剤、TGF 阻害剤、BMP4、レチノイン酸、及びカルボキシペプチダーゼM(CPM)に特異的親和性を有する試薬を含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法によりヒト多能性幹細胞からヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を製造するためのキット。

【請求項 16】

前記GSK3 阻害剤がCHIR99021であり、前記BMP阻害剤がNogginであり、且つ前記TGF

10

20

30

40

50

阻害剤がSB431542である、請求項 1 5 記載のキット。

【請求項 1 7】

さらにROCK阻害剤及び/又はHDAC阻害剤を含有する、請求項 1 5 又は 1 6 記載のキット

。

【請求項 1 8】

前記ROCK阻害剤がY-27632であり、及び/又は前記HDAC阻害剤が酪酸ナトリウムである、請求項 1 7 記載のキット。

【請求項 1 9】

アクチビンA、GSK3 阻害剤、BMP阻害剤、TGF 阻害剤、BMP4、レチノイン酸、及びカルボキシペプチダーゼM(CPM)に特異的親和性を有する試薬を含有する、請求項 5 ~ 1 0 のいずれか 1 項記載の方法によりヒト多能性幹細胞からヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を製造するためのキット。

10

【請求項 2 0】

前記GSK3 阻害剤がCHIR99021であり、前記BMP阻害剤がNogginであり、且つ前記TGF阻害剤がSB431542である、請求項 1 9 記載のキット。

【請求項 2 1】

さらにROCK阻害剤及び/又はHDAC阻害剤を含有する、請求項 1 9 又は 2 0 記載のキット

。

【請求項 2 2】

前記ROCK阻害剤がY-27632であり、及び/又は前記HDAC阻害剤が酪酸ナトリウムである、請求項 2 1 記載のキット。

20

【請求項 2 3】

さらにステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤及びKGFを含有する、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 2 4】

前記ステロイド剤がデキサメタゾンであり、前記cAMP誘導体が8Br-cAMPであり、且つ前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がIBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthine)である、請求項 2 3 記載のキット。

【請求項 2 5】

アクチビンA、GSK3 阻害剤、BMP阻害剤、TGF 阻害剤、BMP4、レチノイン酸、ステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤、FGF10、KGF、及びカルボキシペプチダーゼM(CPM)に特異的親和性を有する試薬を含有する、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の方法によりヒト多能性幹細胞からヒト肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団を製造するためのキット。

30

【請求項 2 6】

前記GSK3 阻害剤がCHIR99021であり、前記BMP阻害剤がNogginであり、前記TGF 阻害剤がSB431542であり、前記ステロイド剤がデキサメタゾンであり、前記cAMP誘導体が8Br-cAMPであり、且つ前記ホスホジエステラーゼ阻害剤がIBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthine)である、請求項 2 5 記載のキット。

【請求項 2 7】

さらにROCK阻害剤及び/又はHDAC阻害剤を含有する、請求項 2 5 又は 2 6 記載のキット

。

【請求項 2 8】

前記ROCK阻害剤がY-27632であり、及び/又は前記HDAC阻害剤が酪酸ナトリウムである、請求項 2 7 記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造する方法に関する。本発明はまた、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造するためのキットに関する。

50

【背景技術】

【0002】

肺は最も複雑な組織の一つであり、約40の異なる細胞種からなると考えられている。このうち肺胞は、ガスを溜める肺胞腔と、これを囲む肺胞上皮からなる。さらに、肺胞上皮はI型肺胞上皮細胞とII型肺胞上皮細胞からなる。前者は、肺胞を取り囲む毛細血管内皮細胞と基底膜を介して血液空気関門を形成し、肺胞内ガスと血液ガスの交換を行う。後者は層板小体を多く含み、肺サーファクタントを開口分泌し、肺胞被覆層を形成していると言われている。

近年、胚性幹細胞（ES細胞）や、体細胞へ未分化細胞特異的遺伝子を導入することで得られる人工多能性幹細胞（iPS細胞）など多能性を有する細胞がこれまでに報告されており（USP 5,843,780およびWO2007/069666）、これらの細胞から肺胞上皮細胞の誘導方法（非特許文献1～3）が報告され、誘導に必要な増殖因子等の報告もされている。しかし、ヒトの肺胞の細胞を効率よく誘導できている例はない。

また、肺胞の破壊される疾患として、肺気腫、間質性肺炎、リンパ脈管筋腫症などが挙げられる。特に肺気腫は、現在のところ、対症療法や保存療法が行われており、根治療法はない。他の肺胞性疾患においても根治療法はなく、細胞移植療法の実現が望まれている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Rippon H J et al, Cloning Stem Cells . 6 : 49 - 56 , 2004

【非特許文献2】Coraux C et al, Am J Respir Cell Mol Biol . 32 : 87 - 92 , 2005

【非特許文献3】Morrisey EE and Hogan BL . Dev Cell . 18 : 8 - 23 , 2010

【発明の概要】

【0004】

本発明は、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造する方法を提供することを目的とする。本発明はまた、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造するためのキットを提供することを目的とする。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、各種増殖因子および化合物を用いることによって、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を分化誘導できることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下を包含する。

[1] 多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造する方法であって、次の(1)～(3)の工程を含む、前記方法；

(1) 多能性幹細胞をアクチビンAおよびGSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程、

(2) (1)の工程で得られた細胞をBMP阻害剤およびTGF 阻害剤を含む培養液中で培養する工程、および、

(3) (2)の工程で得られた細胞をBMP4、レチノイン酸およびGSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程。

[2] 前記工程(3)の後に、さらにCPMが陽性であることを指標として肺胞上皮前駆細胞を抽出する工程を含む、[1]に記載の方法。

[3] 前記工程(1)において、さらにROCK阻害剤および/またはHDAC阻害剤を培養液に添加して多能性幹細胞を培養する、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記工程(1)が、6日以上の間培養する工程である、[1]～[3]のいずれか1項に記載の方法。

[5] 前記工程(2)が、4日以上の間培養する工程である、[1]～[4]のいずれ

10

20

30

40

50

れか 1 項に記載の方法。

[6] 前記工程 (3) が、4 日以上の間培養する工程である、[1] ~ [5] のいずれか 1 項に記載の方法。

[7] 前記 G S K 3 阻害剤が C H I R 9 9 0 2 1 であり、前記 B M P 阻害剤が N o g g i n であり、且つ前記 T G F 阻害剤が S B 4 3 1 5 4 2 である、[1] ~ [6] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8] 前記 R O C K 阻害剤が Y - 2 7 6 3 2 であり、および / または前記 H D A C 阻害剤が酪酸ナトリウムである、[3] ~ [7] のいずれか 1 項に記載の方法。

[9] 前記工程 (3) の後に、さらに、次の (4) および (5) の工程を含む、[1] ~ [8] のいずれか 1 項に記載の方法；

(4) (3) の工程で得られた細胞を F G F 1 0 を含む培養液中で培養する工程、および、

(5) (4) の工程で得られた細胞をステロイド剤、c A M P 誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤および K G F を含む培養液中で培養する工程。

[1 0] 前記工程 (5) の後に、さらに C P M が陽性であることを指標として肺胞上皮前駆細胞を抽出する工程を含む、[9] に記載の方法。

[1 1] 前記工程 (4) が、7 日以上の間培養する工程である、[9] または [1 0] に記載の方法。

[1 2] 前記工程 (5) が、4 日以上の間培養する工程である、[9] ~ [1 1] のいずれか 1 項に記載の方法。

[1 3] 前記ステロイド剤がデキサメタゾンであり、前記 c A M P 誘導体が 8 B r - c A M P であり、且つ前記ホスホジエステラーゼ阻害剤が I B M X (3 - I s o b u t y l - 1 - m e t h y l x a n t h i n e) である、[9] ~ [1 2] のいずれか 1 項に記載の方法。

[1 4] 前記肺胞上皮前駆細胞が、ヒト肺胞上皮前駆細胞である、[1] ~ [1 3] のいずれか 1 項に記載の方法。

[1 5] [1] または [2] に記載の方法で製造された肺胞上皮前駆細胞を、さらに 3 次元培養する工程を含む、肺胞上皮前駆細胞の製造方法。

[1 6] [1] ~ [1 5] のいずれか 1 項に記載の方法で製造された肺胞上皮前駆細胞。

[1 7] アクチピン A、G S K 3 阻害剤、B M P 阻害剤、T G F 阻害剤、B M P 4、レチノイン酸、ステロイド剤、c A M P 誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤、F G F 1 0 および K G F を含有する、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造するためのキット。

[1 8] さらに R O C K 阻害剤および / または H D A C 阻害剤を含有する、[1 7] に記載のキット。

[1 9] 前記 G S K 3 阻害剤が C H I R 9 9 0 2 1 であり、前記 B M P 阻害剤が N o g g i n であり、前記 T G F 阻害剤が S B 4 3 1 5 4 2 であり、前記ステロイド剤がデキサメタゾンであり、前記 c A M P 誘導体が 8 B r - c A M P であり、且つ前記ホスホジエステラーゼ阻害剤が I B M X である、[1 7] または [1 8] に記載のキット。

[2 0] 前記 R O C K 阻害剤が Y - 2 7 6 3 2 であり、および / または前記 H D A C 阻害剤が酪酸ナトリウムである、[1 8] または [1 9] に記載のキット。

[2 1] 肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団から、C P M が陽性であることを指標として肺胞上皮前駆細胞を抽出する工程を含む、肺胞上皮前駆細胞を抽出する方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2 0 1 3 - 0 8 4 0 3 4 号の明細書及び / または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 5 】

図 1 A および B は、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造するスキームを示す。図中、S t a g e I は、S t e p 1 と同意であり、同様に、S t a g e I I は、S t e p 2

10

20

30

40

50

と、Stage IIIは、Step 3と、Stage IVは、Step 4と、およびStage Vは、Step 5と同意であり、以下、全てStepと称す。

図2 Aは、Step 3終了後の細胞におけるCPMおよびNKX2-1の免疫染色像を示す。図2 Bは、Step 2 (上図)およびStep 3 (下図)終了後の細胞におけるCPMおよびNKX2-1の免疫染色像を示す。

図3 Aは、Step 3終了後、CPMを指標としてMACSによりソーティングした後の細胞のCPM陽性細胞率を示す。図中、Isotype controlでは、陰性対照の結果を示し、Pre-sortingでは、MACSによるソーティング前の細胞群の結果を示し、CPM positive selectionでは、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞群の結果を示し、および、CPM negative selectionでは、MACSによりソーティングされたCPM陰性細胞群の結果を示す。図3 Bは、Step 3終了後、CPMを指標としてMACSによりソーティングした後の細胞のCPM陽性細胞率を示す。Pre-sortingでは、MACSによるソーティング前の細胞群の結果を示し、CPM (+) sortingでは、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞群の結果を示し、および、CPM (-) sortingでは、MACSによりソーティングされたCPM陰性細胞群の結果を示す。

10

図4 Aは、Step 3終了後、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞 (CPM (+) sorting) およびCPM陰性細胞 (CPM (-) sorting) におけるCPMおよびNKX2-1の免疫染色像を示す。図4 Bは、Step 3終了後、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞 (CPM (+) sorting) およびCPM陰性細胞 (CPM (-) sorting) におけるNKX2-1の免疫染色像を示す。

20

図5 Aは、Step 3終了後、MACSによりソーティングされた細胞におけるNKX2-1陽性細胞の含有率を示す。図中、Pre-sortingでは、MACSによるソーティング前の細胞群の結果を示し、CPM positive selectionでは、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞群の結果を示し、および、CPM negative selectionでは、MACSによりソーティングされたCPM陰性細胞群の結果を示す。図5 Bは、Step 3終了後、MACSによりソーティングされた細胞におけるNKX2-1陽性細胞の含有率を示す。図中、CPM⁺ sorted cellsでは、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞群におけるNKX2-1陽性率 (92.3 ± 0.7%) を示し、および、CPM⁻ sorted cellsでは、MACSによりソーティングされたCPM陰性細胞群におけるNKX2-1陽性率 (22.2 ± 2.3%) を示す。

30

図6は、Step 3終了後、MACSによりCPMを指標としてソーティングされた細胞におけるCPM (左図) またはNKX2-1 (右図) のmRNAを定量PCRにて測定した結果を示す。Step 3は、ソーティング前の細胞群での結果を示し、Step 3 (+) は、CPM陽性細胞での結果を示し、Step 3 (-) は、CPM陰性細胞での結果を示し、Fetus Lungは、胎児肺細胞での結果を示し、Adult Lungは、成人肺細胞での結果を示す。

図7は、Step 4終了後、MACSによりソーティングされた細胞におけるCPM (左図) およびNKX2-1 (右図) のmRNAを定量PCRにて測定した結果を示す。Step 4は、ソーティング前の細胞群での結果を示し、Step 4 (+) は、CPM陽性細胞での結果を示し、Step 4 (-) は、CPM陰性細胞での結果を示し、Fetus Lungは、胎児肺細胞での結果を示し、Adult Lungは、成人肺細胞での結果を示す。

40

図8 Aは、iPS細胞 (201B7) のStep 5終了後、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞における免疫染色像を示す。図8 Bは、iPS細胞 (SFTPCレポーター細胞株; SFTPC-reporter 201B7) のStep 5終了後、MACSによりソーティングされたCPM陽性細胞における免疫染色像を示す。図8 Cは、iPS細胞 (SFTPCレポーター細胞株; SFTPC-reporter 201B

50

7) の Step 5 終了後、MACS によりソーティングされた CPM 陽性細胞における EGFP 陽性細胞の含有率を示す。

図 9 A および B は、Step 5 終了後の細胞における免疫染色像を示す。

図 10 は、Step 5 終了後、MACS によりソーティングされた細胞における CPM、NKX2-1、SFTPA2、SFTPB、SFTPC、DCLAMP、CCSP (SCGB1A1)、SCGB3A2 および NGFR の mRNA を定量 PCR にて測定した結果を示す。Step 5 は、ソーティング前の細胞群での結果を示し、Step 5 (+) は、CPM 陽性細胞での結果を示し、Step 5 (-) は、CPM 陰性細胞での結果を示し、Fetus Lung は、胎児肺細胞での結果を示し、Adult Lung は、成人肺細胞での結果を示す。

10

図 11 は、ヒト胎児肺組織における CPM および胎生期、腺様期または肺管状期のマーカーである NKX2-1、SFTPC または T1 との共染色像を示す。

図 12 は、マウスの各胎生期 (E12.5、E15.5 および E17.5) の肺組織における CPM と胎生期、腺様期および肺管状期マーカーである NKX2-1 との共染色像を示す。

図 13 は、Step 3 終了後の細胞のうち CPM 陽性細胞をソーティングし、ヒト胎児肺線維芽細胞と共培養する方法の概要を示す。

図 14 A は、Step 3 終了後の CPM 陽性細胞を 3 次元培養した後のスフェロイドの透過電子顕微鏡像を示す。中央図および右図は、左図の拡大図を示す。図 14 B は、マウス肺の II 型肺胞上皮細胞の透過電子顕微鏡像を示す。右図は、左図の拡大図を示す。図 14 C は、E17.5 のマウス胎児肺の透過電子顕微鏡像を示す。右図は、左図の拡大図を示す。各図中に記載された Lu は管腔を示す。

20

図 15 A は、Step 3 終了後の CPM 陽性細胞 (左図) および CPM 陰性細胞 (右図) を 3 次元培養した後のヘマトキシリン - エオシン染色像を示す。下図は、上図の拡大図を示す。図 15 B は、Step 3 終了後の CPM 陽性細胞を 3 次元培養した後のスフェロイドを、CPM、NKX2-1、GFP (SFTPC)、SFTPC (endogenous)、および AQP5 抗体を用いて免疫染色した像を示す。

図 16 は、Step 3 終了後の CPM 陽性細胞を 3 次元培養した後のスフェロイドを、CPM、NKX2-1、SFTPC、SFTPB、SFTPA、SFTPD、ID2、および SOX9 抗体を用いて免疫染色した像を示す。各肺胞上皮細胞関連蛋白質を、CPM または NKX2-1 のいずれかと 2 重染色した像を右図に示す。

30

図 17 は、Step 3 終了後の CPM 陽性細胞を 3 次元培養した後のスフェロイドを、T1、SFTPC、AQP5、および CAV1 抗体を用いて免疫染色した像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0006】

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明は、多能性幹細胞を、(1) アクチビン A および GSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程、(2) BMP 阻害剤および TGF 阻害剤を含む培養液中で培養する工程、および (3) BMP4、レチノイン酸および GSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程を含む、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞 (例えば、ヒト肺胞上皮前駆細胞) を製造する方法を提供する。

40

本発明において、肺胞上皮前駆細胞を製造するにあたり、工程 (3) の後に、CPM が陽性であることを指標として肺胞上皮前駆細胞を抽出する工程を含んでも良い。

本発明において、肺胞上皮前駆細胞に製造するにあたり、工程 (3) の後に、さらに、(4) FGF10 を含む培養液中で培養する工程、および、(5) ステロイド剤、cAMP 誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤および KGF を含む培養液中で培養する工程を含んでも良い。また、工程 (5) の後に、CPM が陽性であることを指標として肺胞上皮前駆細胞を抽出する工程を含んでも良い。

本発明において、肺胞上皮前駆細胞とは、I 型肺胞上皮細胞または II 型肺胞上皮細胞の前駆細胞を意味し、CPM または NKX2-1 を発現している細胞である。本明細書に

50

において肺胞上皮細胞は、肺胞上皮前駆細胞と同等の細胞を意味し、特別の断りがなければ、この2つの細胞を区別しない。本発明において、CPMは、NCBIアクセッション番号：NM_001005502、NM-001874またはNM_198320で示されるポリヌクレオチドおよびこれらがコードするタンパク質である。本発明において、NKX2-1は、NCBIアクセッション番号：NM_001079668またはNM_003317で示されるポリヌクレオチドおよびこれらがコードするタンパク質である。

本発明において、肺胞上皮前駆細胞のマーカーとして、SFTPB (NCBIアクセッション番号：NM_000542またはNM_198843)、SFTPC (NCBIアクセッション番号：NM_001172357、NM_001172410またはNM_003018) およびCCSP (NCBIアクセッション番号：NM_003357) から成る群より選択されるポリヌクレオチドおよびこれらがコードするタンパク質が例示される。

10

<アクチビンAおよびGSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程>

本発明の多能性幹細胞を培養する工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。より好ましくは、B27および抗生物質を添加したRPMI1640培地である。

20

本工程では、上記の基礎培地へアクチビンAおよびGSK3 阻害剤を添加して多能性幹細胞を培養することによって行われる。本工程では、さらにHDAC阻害剤を添加してもよい。

30

ここで、アクチビンAは、2つのベータA鎖のホモダイマーであり、アクチビンAのアミノ酸配列は、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ネコのタンパク質で100%の相同性があるため、特に種の限定はされない。本発明において好ましくは、N末端ペプチドが切断された活性型であり、inhibin beta A鎖 (例えば、NCBIアクセッション番号：NP_002183) のN末端ペプチドが切断されたGly311-Ser426断片がジスルフィド結合したホモダイマーである。このようなアクチビンAは、例えば、Wako社R&D Systems社から購入可能である。

培養液中におけるアクチビンAの濃度は、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、150 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/mlおよび1 mg/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、100 ng/mlである。

40

ここで、GSK3 阻害剤とは、GSK-3 タンパク質のキナーゼ活性 (例えば、カテニンに対するリン酸化能) を阻害する物質として定義され、既に多数のものが知られているが、例えば、インジルピン誘導体であるBIO (別名、GSK-3 阻害剤IX; 6-プロモインジルピン3'-オキシム)、マレイミド誘導体であるSB216763 (3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)

50

- 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン)、フェニル プロモメチルケトン化合物である GSK - 3 阻害剤 V I I (4 - ジブromoアセトフェノン)、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドである L 8 0 3 - m t s (別名、GSK - 3 ペプチド阻害剤; Myr - N - G K E A P P A P P Q S p P - N H ₂) および高い選択性を有する C H I R 9 9 0 2 1 (6 - [2 - [4 - (2 , 4 - D i c h l o r o p h e n y l) - 5 - (4 - m e t h y l - 1 H - i m i d a z o l - 2 - y l) p y r i m i d i n - 2 - y l a m i n o] e t h y l a m i n o] p y r i d i n e - 3 - c a r b o n i t r i l e) が挙げられる。これらの化合物は、例えば Calbiochem 社や Biomol 社等から市販されており容易に利用することが可能であるが、他の入手先から入手してもよく、あるいはまた自ら作製してもよい。

10

本発明で使用される GSK - 3 阻害剤は、好ましくは、CHIR99021 であり得る。本工程における、培養液中における CHIR99021 の濃度は、例えば、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、750 nM、1 μM、1.5 μM、2 μM、2.5 μM、3 μM、3.5 μM、4 μM、4.5 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、15 μM、20 μM、25 μM、30 μM、40 μM、50 μM であるがこれらに限定されない。本工程では、好ましくは、1 μM である。

ここで、HDAC 阻害剤とは、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の酵素活性を阻害または失活させる物質として定義され、例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795 - 797 (2008))、トリコスタチン A、酪酸ナトリウム (NaB)、MC1293、M344 等の低分子阻害剤、HDAC に対する siRNA および shRNA (例えば、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene) 等) 等の核酸性発現阻害剤など、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば 5' - azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795 - 797 (2008)) が挙げられる。

20

本発明で使用される HDAC 阻害剤は、好ましくは、酪酸ナトリウム (NaB) であり得る。培養液中における酪酸ナトリウム (NaB) の濃度は、例えば、1 μM、10 μM、50 μM、100 μM、250 μM、500 μM、750 μM、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM であるがこれらに限定されない。好ましくは、250 μM である。

30

本工程において、コーティング処理された培養容器を用いて培養してもよい。コーティング剤としては、天然由来または人工的に合成された細胞外マトリックスでよく、例えば、マトリゲル (BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

本工程において、多能性幹細胞を解離させる工程を含んでも良い。細胞を解離させる方法としては、例えば、力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液 (例えば、Accutase (TM) および Accumax (TM) など) またはコラゲナーゼ活性のみを有する解離溶液を用いた解離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液 (特に好ましくは、Accutase (TM)) を用いてヒト多能性幹細胞を解離する方法が用いられる。

40

本工程において、解離させる工程を含む場合、解離により多能性幹細胞の細胞死を抑制するため、ROCK 阻害剤を培養液に添加することで行うことができる。

ここで、ROCK 阻害剤とは、Rhoキナーゼ (ROCK) の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y - 27632 ((+) - (R) - trans - 4 - (1 - aminoethyl) - N - (4 - pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride) (例えば、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976 - 983 (2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273 - 284 (2000) 参照)、Fasudil / HA1077 (例えば、Uenata et

50

al., Nature 389:990-994(1997)参照)、H-1152(例えば、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93:225-232(2002)参照)、Wf-536(例えば、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4):319-324(2003)参照)およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸(例えば、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の低分子化合物も知られているので、本発明においてはこのような化合物またはそれらの誘導体も使用できる(例えば、米国特許出願公開第20050209261号、同第20050192304号、同第20040014755号、同第20040002508号、同第20040002507号、同第20030125344号、同第20030087919号、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照)。本発明では、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。

10

本発明で使用されるROCK阻害剤は、好ましくは、Y-27632であり得る。Y-27632の濃度は、例えば、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、10μMである。

培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。

20

培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、6日以上であり、特に好ましくは、6日である。また、ROCK阻害剤を添加する場合、その添加する期間は1日または2日であり、好ましくは1日である。さらに、HDAC阻害剤を添加する場合、本工程開始の翌日から添加して、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、またはそれ以上の日数、好ましくは、5日以上であり、特に好ましくは、5日間、HDAC阻害剤の存在下で培養する方法が例示される。

30

< BMP阻害剤およびTGFβ阻害剤を含む培養液中で培養する工程 >

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium(ライフテクノロジーズ)およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント(Invitrogen)、B27サプリメント(Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax(Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましくは、Glutamax、B27、N2、3'-チオールグリセロールおよびアスコルビン酸を添加したDMEM培地およびHam's F12培地の混合培地である。

40

本工程では、上記の基礎培地へBMP阻害剤およびTGFβ阻害剤を添加して前記工程

50

(多能性幹細胞をアクチビンAおよびGSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程)により得られた細胞を培養することによって行われる。

ここで、BMP阻害剤とは、Chordin、Noggin、Follistatin、などのタンパク質性阻害剤、Dorsomorphin(すなわち、6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)、その誘導体(P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116: II_60; P. B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4: 33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3(8): e2904)およびLDN-193189(すなわち、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline)が例示される。DorsomorphinおよびLDN-193189は市販されており、それぞれSigma-Aldrich社およびStemgent社から入手可能である。

10

本発明で使用されるBMP阻害剤は、好ましくは、Nogginであり得る。培養液中におけるNogginの濃度は、BMPを阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、1ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml、1μg/ml、2μg/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、200ng/mlである。

20

ここで、TGF阻害剤とは、TGFの受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質、またはALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質である限り特に限定されず、例えば、Lefty-1(NCBI Accession No.として、マウス: NM_010094、ヒト: NM_020997が例示される)、SB431542(4-(4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide)、SB202190(以上、R. K. Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2: 20)、SB505124(GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208(Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276(Lilly Research Laboratories)、A-83-01(WO 2009146408)およびこれらの誘導体などが例示される。

30

本発明で使用されるTGF阻害剤は、好ましくは、SB431542であり得る。培養液中におけるSB431542の濃度は、TGFを阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、35μM、40μM、45μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM、100μM、200μM、300μM、400μMおよび500μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、10μMである。

40

本工程において、コーティング処理された培養容器を用いて培養してもよい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

本工程は、前記工程により得られた細胞の培養液を上記培養液へと交換することによって行われても良い。また、細胞を解離させ、再度、培養容器に播種することによって行われてもよい。このように細胞を解離させる場合、特定の細胞を選択してもよく、例えば、SOX17および/またはFOX A2の陽性細胞を選択して、本工程に用いても良い。好ましくは、培養液を交換することによって行われる方法である。

本工程において、解離させる工程を含む場合、解離により多能性幹細胞の細胞死を抑制

50

するため、ROCK阻害剤を培養液に添加することで行うことができる。

培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2～5%である。

培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、4日である。

< BMP 4、レチノイン酸およびGSK3阻害剤を含む培養液中で培養する工程 >

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましくは、Glutamax、B27、N2、3'-チオールグリセロールおよびアスコルビン酸を添加したDMEM培地およびHam's F12培地の混合培地である。

本工程では、上記の基礎培地へBMP 4、レチノイン酸およびGSK3阻害剤を添加して前記工程 (BMP阻害剤およびTGF阻害剤を含む培養液中で培養する工程) により得られた細胞を培養することによって行われる。

ここで、BMP 4とは、NCBIのアクセッション番号NM_001202、NM_130850またはNM_130851で示されるポリヌクレオチドによってコードするタンパク質であり、プロテアーゼによる切断を受けて活性化された形態であってもよい。

培養液中におけるBMP 4の濃度は特に限定されないが、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/ml、1 μg/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、100 ng/mlである。

ここで、レチノイン酸とは、全トランスレチノイン酸 (ATRA) が例示されるが、天然のレチノイン酸が有する機能を保持しながら人工的に修飾されたレチノイン酸であってもよく、例えば、4-[[(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthalenyl) carbonyl] amino] - Benzoic acid (AM580) (Tamura K, et al., Cell Differ Dev. 32: 17-26 (1990))、4-[(1E)-2-(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propen-1-yl] - Benzoic acid (TTNPB) (Strickland S, et al., Cancer Res. 43: 5268-5272 (1983))、パルミチン酸レチノール、レチノール、レチナール、3-デヒドロレチノイン酸、3-デヒドロレチノール、3-デヒドロレチナールもしくは、Abe, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 4990-4994 (1981); Schwartz, E. L. et

10

20

30

40

50

al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24:18 (1983); Tanenaga, K. et al., Cancer Res. 40:914-919 (1980)に記載されている化合物が挙げられる。

培養液中におけるレチノイン酸の濃度は、特に限定されないが、例えば、1 nM、5 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1 μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、50 nMである。

本工程におけるGSK3 阻害剤は、上述したGSK3 阻害剤を用いることができ、好ましくは、CHIR99021であり得る。本工程における、培養液中におけるCHIR99021の濃度は、例えば、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、750 nM、1 μM、1.5 μM、2 μM、2.5 μM、3 μM、3.5 μM、4 μM、4.5 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、15 μM、20 μM、25 μM、30 μM、40 μM、50 μMであるがこれらに限定されない。本工程では、好ましくは、2.5 μMである。

本工程において、コーティング処理された培養容器を用いて培養してもよい。コーティング剤としては、天然由来または人工的に合成された細胞外マトリックスでよく、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

本工程は、前記工程により得られた細胞の培養液を上記培養液へと交換することによって行われてもよい。また、細胞を解離させ、再度、培養容器に播種することによって行われてもよい。このように細胞を解離させる場合、特定の細胞を選択してもよく、例えば、SOX2および/またはSOX17および/またはFOXA2の陽性細胞を選択して、本工程に用いてもよい。好ましくは、培養液を交換することによって行われる方法である。

本工程において、解離させる工程を含む場合、解離により多能性幹細胞の細胞死を抑制するため、ROCK阻害剤を培養液に添加することで行うことができる。

培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。

培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、4日以上であり、より好ましくは4日である。

<FGF10を含む培養液中で培養する工程>

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium199培地、Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium(ライフテクノロジーズ)およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント(Invitrogen)、B27サプリメント(Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax(Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましくは、Glutama

x、B27、N2、3'-チオールグリセロールおよびアスコルビン酸を添加したDMEM培地およびHam's F12培地の混合培地である。

本工程では、上記の基礎培地へFGF10を添加して前記工程(BMP4、レチノイン酸およびGSK3阻害剤を含む培養液中で培養する工程)により得られた細胞を培養することによって行われる。

ここで、FGF10とは、NCBIのアクセッション番号NM_004465で示されるポリヌクレオチドによってコードするタンパク質であり、プロテアーゼによる切断を受けて活性化された形態であってもよい。このようなFGF10は、例えば、Life Technologies社またはWako社から入手可能である。

培養液中におけるFGF10の濃度は特に限定されないが、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/ml、1 μg/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、100 ng/mlである。

本工程において、コーティング処理された培養容器を用いて培養してもよい。コーティング剤としては、天然由来または人工的に合成された細胞外マトリックスでよく、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

本工程は、前記工程により得られた細胞の培養液を上記培養液へと交換することによって行われてもよい。また、細胞を解離させ、再度、培養容器に播種することによって行われてもよい。このように細胞を解離させる場合、特定の細胞を選択してもよく、例えば、NKX2-1および/またはFOXA2の陽性細胞を選択して、本工程に用いてもよい。好ましくは、培養液を交換することによって行われる方法である。

本工程において、解離させる工程を含む場合、解離により多能性幹細胞の細胞死を抑制するため、ROCK阻害剤を培養液に添加することで行うことができる。

培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。

培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、14日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、7日以上あり、より好ましくは7日である。

<ステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤およびKGFを含む培養液中で培養する工程>

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium199培地、Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium(ライフテクノロジー)およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント(Invitrogen)、B27サプリメント(Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、ITSプレミックス、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax(Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質

10

20

30

40

50

、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましくは、アルブミン、緩衝剤（例えば、HEPES）、塩化カルシウム、ITSプレミックスおよび抗生物質を含有するHam's F12培地である。

本工程では、上記の基礎培地へステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤およびKGFを添加して前記工程（FGF10を含む培養液中で培養する工程）により得られた細胞を培養することによって行われる。

ここで、ステロイド剤とは、ステロイド系抗炎症薬であり、グルココルチコイドあるいはその合成誘導体であり、例えば、ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、コハク酸メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、ベタメタゾンが例示される。

10

本発明で使用されるステロイド剤は、好ましくは、デキサメタゾンであり得る。培養液中におけるデキサメタゾンの濃度は特に限定されないが、例えば、1 nM、5 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1 μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、50 nMである。

ここで、cAMP誘導体とは、cyclic AMPへ置換基が修飾された化合物であり、例えば、cyclic adenosine monophosphate (cAMP)、8-bromo cyclic adenosine monophosphate (8-Br-cAMP又は8Br-cAMP)、8-chloro cyclic adenosine monophosphate (8-Cl-cAMP)、8-(4-chlorophenylthio)cyclic adenosine monophosphate (8-CPT-cAMP)およびDibutyryl cyclic adenosine monophosphate (DB-cAMP)が例示される。

20

本発明で使用されるcAMP誘導体は、好ましくは、8-Br-cAMPであり得る。培養液中における8-Br-cAMPの濃度は特に限定されないが、例えば、1 μM、5 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、200 μM、300 μM、400 μM、500 μM、600 μM、700 μM、800 μM、900 μM、1 mMであるがこれらに限定されない。好ましくは、100 μMである。

30

ここで、ホスホジエステラーゼ阻害剤とは、ホスホジエステラーゼ(PDE)を阻害することにより、cAMPあるいはcGMPの細胞内濃度を上昇させる化合物であり、例えば、1,3-Dimethylxanthine、6,7-Dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)isoquinoline、4-{[3',4'-(Methylenedioxy)benzyl]amino}-6-methoxyquinazoline、8-Methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthineおよび3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)が例示される。

本発明で使用されるホスホジエステラーゼ阻害剤は、好ましくは、IBMXであり得る。培養液中におけるIBMXの濃度は特に限定されないが、例えば、1 μM、5 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、200 μM、300 μM、400 μM、500 μM、600 μM、700 μM、800 μM、900 μM、1 mMであるがこれらに限定されない。好ましくは、100 μMである。

40

ここで、KGFとは、NCBIのアクセッション番号NM_002009で示されるポリヌクレオチドによってコードするタンパク質であり、プロテアーゼによる切断を受けて活性化された形態であってもよい。このようなKGFは、例えば、Wako社から入手することができる。

培養液中におけるKGFの濃度は特に限定されないが、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70

50

ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/ml、1 μg/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、100 ng/mlである。

本工程において、コーティング処理された培養容器を用いて培養してもよい。コーティング剤としては、天然由来または人工的に合成された細胞外マトリックスでよく、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

本工程は、前記工程により得られた細胞の培養液を上記培養液へと交換することによって行われてもよい。また、細胞を解離させ、再度、培養容器に播種することによって行われてもよい。このように細胞を解離させる場合、特定の細胞を選択してもよく、例えば、NKX2-1の陽性細胞を選択して、本工程に用いてもよい。好ましくは、培養液を交換することによって行われる方法である。

10

本工程において、解離させる工程を含む場合、解離により多能性幹細胞の細胞死を抑制するため、ROCK阻害剤を培養液に添加することで行うことができる。

培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。

培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、4日以上であり、特に好ましくは、4日である。

20

< 3次元培養 >

本発明において、肺胞上皮前駆細胞をさらに成熟化させるために、肺胞上皮前駆細胞を3次元培養する方法を提供する。本発明において、3次元培養とは、細胞を塊(スフェロイド)として浮遊状態で培養することを意味する。本発明の3次元培養では、例えば、BD社が提供するセルカルチャーインサートを使用して行うことができる。

本発明の3次元培養では、他の細胞種と共培養しても良く、この時用いる他の細胞種としては、ヒト肺線維芽細胞、およびヒト胎児肺線維芽細胞が例示され、このような細胞は、例えば、American Type Culture Collection(ATCC)およびDVBiotics社などから入手可能である。

30

本発明の3次元培養において、用いる培養液は、上述のステロイド剤、cAMP誘導体、ホスホジエステラーゼ阻害剤およびKGFを含む培養液中で培養する工程で用いる培養液を用いることができ、好ましくは、培養液に細胞外基質を添加して用いてもよい。細胞外基質と培養液の比率は特に限定されないが、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4および1:5の比率で混合することが例示される。本発明において、細胞外基質とは、細胞の外に存在する超分子構造体であり、天然由来であっても、人工物(組換え体)であってもよい。例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、テネイシン、エンタクチン、エラスチン、フィブリリン、ラミニンといった物質またはこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、組み合わせて用いられてもよく、例えば、BD Matrigel(TM)などの細胞からの調製物であってもよい。人工物としては、ラミニンの断片が例示される。

40

3次元培養での培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、10日以上であり、特に好ましくは、10日、11日または12日である。

< 多能性幹細胞 >

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在する全ての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、例えば胚性幹(ES)細胞

50

胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹 (ntES) 細胞、精子幹細胞 (「GS細胞」)、胚性生殖細胞 (「EG細胞」)、人工多能性幹 (iPS) 細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞 (Muse細胞) などが含まれる。本発明では、胚の破壊を行わずに得られると意味では、iPS細胞またはMuse細胞を用いることが好ましい。

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚 (例えば胚盤胞) の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され (M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), Nature 292: 154 - 156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された (J. A. Thomson et al. (1998), Science 282: 1145 - 1147; J. A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7844 - 7848; J. A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55: 254 - 259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38: 133 - 165)。

ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor (bFGF)) などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5, 843, 780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92: 7844 - 7848; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282: 1145 - 1147; H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345: 926 - 932; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 9554 - 9559; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222: 273 - 279; H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 1580 - 1585; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444: 481 - 485などに記載されている。

ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20%KSRおよび4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37、5%CO₂、湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる (H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345: 926 - 932)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要がある、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂ および20%KSRを含有するPBS中の0.25%トリプシンおよび0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる (E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 443 - 452)。

ヒトES細胞株 (例えばWA01 (H1) およびWA09 (H9)) は、WiCell Research Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhE

10

20

30

40

50

S - 3 は、京都大学再生医科学研究所（京都、日本）から入手可能である。

(B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69: 612 - 616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119: 1001 - 1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すこと
10

(C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子 (stem cell factor) などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる (Y. Matsui et al. (1992) *Cell*, 70: 841 - 847; J. L. Resnick et al. (1992), *Nature*, 359: 550 - 551)。

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹 (iPS) 細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126: 663 - 676; K. Takahashi et al. (2007), *Cell*, 131: 861 - 872; J. Yu et al. (2007), *Science*, 318: 1917 - 1920; Nakagawa, M. ら, *Nat. Biotechnol.* 26: 101 - 106 (2008); 国際公開WO2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくは non-coding RNA またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくは non-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい
20
30
40
50

。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sal11、Sal14、Esrrb、Nr5a2、Tbx3 または Glis1 等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 795 - 797、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 2: 525 - 528、Eminli S, e

t al. (2008), Stem Cells. 26: 2467 - 2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26: 1269 - 1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568 - 574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3: 475 - 479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132 - 135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11: 197 - 203、R. L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27: 459 - 461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 8912 - 8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461: 649 - 643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5: 491 - 503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6: 167 - 74、Han J, et al. (2010), Nature. 463: 1096 - 1000、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28: 713 - 720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474: 225 - 9. に記載の組み合わせが例示される。

10

上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase - 3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5 - azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX - 01294等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L - channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA - 83 - 01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR - 291 - 3p、miR - 294、miR - 295およびmir - 302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

20

30

40

初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド (例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン)との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リボソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター (以上、Cell, 126, pp. 663 - 676, 2006; Cell, 131, pp. 861 - 872, 2007; Science, 318, pp. 1917 - 1920, 2007)、アデノウイルスベクター (Science, 322, 945 - 949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター (

50

WO 2010/008054)などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用する(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

10

また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine(Trilink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い(Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。

iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液(これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液(霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technology社)]などが含まれる。

20

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30~約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

30

あるいは、37℃、5%CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液(これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)で培養し、約25~約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる(Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはWO2010/137746)、もしくは細胞外基質(例えば、Laminin-5(WO2009/123349)およびマトリゲル(BD社))を用いる方法が例示される。

40

この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される(Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件(0.1%以上、15%以下の酸素濃度)によりiPS細胞を樹立しても良い(Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO2010/013845)。

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約5×10³~約5×10⁶細胞の範囲である。

50

i P S細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct 3 / 4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したi P S細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、i P S細胞を選択することができる。

本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、非限定的に、胎児（仔）の体細胞、新生児（仔）の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

また、i P S細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), Science, 292: 740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72: 932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450: 497-502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES (nuclear transfer ES) 細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（J. B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16: 642-646）とES細胞作製技術との組み合わせが利用される（若山清香ら（2008）, 実験医学, 26巻, 5号（増刊）, 47~52頁）。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

(F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)

Muse細胞は、WO2011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

<多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞への分化誘導用キット>

本発明は、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を分化誘導（又は製造）するためのキットを提供する。本キットには、上述した分化誘導に用いる増殖因子、化合物、培養液、解離溶液および培養容器のコーティング剤を含んでもよい。本キットには、さらに分化誘導の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

<肺胞上皮前駆細胞を選択する方法>

本発明において、肺胞上皮前駆細胞とは、肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団であればよく、好ましくは、本発明において、肺胞上皮前駆細胞を含有する細胞集団とは、肺胞

10

20

30

40

50

上皮前駆細胞を50%、60%、70%、80%または90%以上含有する細胞集団である。

従って、本発明は、肺胞上皮前駆細胞を抽出する方法を提供する。抽出される細胞集団は、上述の方法で得られた肺胞上皮前駆細胞であってもよく、その製造工程((3)BMP4、レチノイン酸およびGSK3 阻害剤を含む培養液中で培養する工程の終了後または(4)FGF10を含む培養液中で培養する工程の終了後)において得られる細胞集団であってもよい。肺胞上皮前駆細胞の抽出は、CPMに特異的親和性を有する試薬を用いて行うことができる。CPMはこれまで成人のI型の肺胞上皮細胞のマーカーとして知られていたが、発生過程の前駆細胞で発現していることは知られておらず、肺胞上皮前駆細胞のマーカーであるNKX2-1と同等に表面マーカーとして用いることが本発明により初めて見出されたものである。

10

ここで、特異的親和性を有する試薬とは、抗体、アプタマー、ペプチドまたは特異的に認識する化合物などを用いることができ、好ましくは、抗体もしくはその断片である。

本発明において、抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってもよい。これらの抗体は、当業者に周知の技術を用いて作成することが可能である(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12-11.13)。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌または哺乳類細胞株等で発現し精製したCPMがコードするタンパク質、部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドあるいは糖脂質を精製して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、上述の免疫された非ヒト動物から得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4-11.11)。抗体の断片としては、抗体の一部(たとえばFab断片)または合成抗体断片(たとえば、一本鎖Fv断片「ScFv」)が例示される。FabおよびF(ab)2断片などの抗体の断片もまた、遺伝子工学的に周知の方法によって作製することができる。例えば、CPMに対する抗体をLeica microsystems社より入手することができる。

20

30

CPMを発現する細胞を認識または分離することを目的として、当該親和性を有する試薬は、例えば、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識、酵素、ビオチンまたはストレプトアビジン等の検出可能な物質またはプロテインA、プロテインG、ビーズまたは磁気ビーズ等の単離抽出を可能とさせる物質と結合または接合されていてもよい。

当該親和性を有する試薬はまた、間接的に標識してもよい。当業者に公知の様々な方法を使用して行い得るが、例えば、当該抗体に特異的に結合する予め標識された抗体(二次抗体)を用いる方法が挙げられる。

肺胞上皮前駆細胞を抽出する方法には、当該親和性を有する試薬へ粒子を接合させ沈降させる方法、磁気ビーズを用いて磁性により細胞を選別する方法(例えば、MACS)、蛍光標識を用いてセルソーターを用いる方法、または抗体等が固定化された担体(例えば、細胞濃縮カラム)を用いる方法等が例示される。

40

<肺胞疾患治療剤>

本発明で得られた肺胞上皮前駆細胞は、製剤として肺胞の破壊される疾患患者に投与することができる。得られた肺胞上皮前駆細胞をシート化して、患者の肺胞上皮に貼付してもよく、生理食塩水等に懸濁させ、患者の肺胞に直接移植することによって行われ得る。従って、本発明では、上記の方法で多能性幹細胞より得られた肺胞上皮前駆細胞を含む肺胞疾患治療剤を提供する。

本発明において、肺胞疾患治療剤に含まれる肺胞上皮前駆細胞の細胞数は、移植片が投与後に生着できれば特に限定されなく、患部の大きさや体躯の大きさに合わせて適宜増減

50

して調製されてもよい。

【実施例】

【0007】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

< i P S細胞培養 >

ヒト i P S細胞 (2 0 1 B 7) は、京都大学の山中教授より受領し、従来の方法で培養した (Takahashi K, et al. Cell. 131: 861 - 872, 2007)。また、Mae S, et al, Nat Commun. 4: 1367, 2013 に記載された方法と同様の方法を用いてヒト i P S細胞 (2 0 1 B 7) の S F T P C の開始コドンの下流に E G F P 配列を Knock - in させた S F T P C - r e p o r t e r 2 0 1 B 7 を作製した。

10

< 肺胞上皮前駆細胞誘導 >

i P S細胞等の多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造するスキームを図1に示す。

肺胞上皮前駆細胞は、ヒト i P S細胞を Accutase により解離させ、マトリゲルコーティングした 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 2.0×10^5 個、またはマトリゲルコーティングした 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 9.6×10^5 個を播種し、次の条件で培養することによって誘導した (図 1 A および B)。

(Step 1)

播種した細胞 (Day 0) を 100 ng/ml Activin A (R & D Systems)、 $1 \mu\text{M}$ CHIR99021 および $10 \mu\text{M}$ Y - 27632 を添加した基礎培地 1 (2 % B27 (Life technologies) および 0 . 5 % Penicillin / streptomycin stock solution (Life technologies) を含有する RPMI 1640 (Nacalaitesque)) 中で培養した。翌日 (Day 1)、 100 ng/ml Activin A、 $1 \mu\text{M}$ CHIR99021 および 0.25 mM NaB を含有する基礎培地 1 へ培地を交換し、翌日 (Day 2) および 3 日後 (Day 4) に同じ条件の培地へ培地を交換し、5 日間培養した。

20

もしくは、播種した細胞 (Day 0) を 100 ng/ml Activin A、 $1 \mu\text{M}$ CHIR99021 および $10 \mu\text{M}$ Y - 27632 を添加した基礎培地 1 中で培養した。翌日 (Day 1)、 100 ng/ml Activin A、 $1 \mu\text{M}$ CHIR99021、 $10 \mu\text{M}$ Y - 27632 および 0.125 mM または 0.25 mM NaB を含有する基礎培地 1 へ培地を交換し、翌日 (Day 2)、 100 ng/ml Activin A、 $1 \mu\text{M}$ CHIR99021、および 0.125 mM または 0.25 mM NaB を含有する基礎培地 1 へ培地を交換し、3 日後 (Day 4) に同じ条件の培地へ培地を交換した。

30

(Step 2)

Step 1 で得られた細胞 (Day 6) を 200 ng/ml または 100 ng/ml hNoggin (R & D Systems) および $10 \mu\text{M}$ SB - 431542 を添加した基礎培地 2 (1 % Glutamax supplement (Life technologies)、2 % B27 supplement、1 % N2 supplement (Life technologies)、0 . 8 % StemSureTM 50 mol/l Monothioglycerol Solution (Wako)、50 $\mu\text{g/ml}$ L - ascorbic acid (Sigma Aldrich) および 0 . 5 % Penicillin / streptomycin stock solution を含有する DMEM / F12 (Life technologies)) 中で 4 日間培養した。この時、2 日に一度同じ条件の培地へ培地を交換した。

40

(Step 3)

Step 2 で得られた細胞 (Day 10) を 100 ng/ml hBMP4 (Human Zyme, Inc.)、 $0.05 \mu\text{M}$ all - trans retinoic ac

50

id (ATRA) および $2.5 \mu\text{M}$ CHIR99021 を含有する基本培地 2 中で 4 日間培養した。この時、2 日に一度同じ条件の培地へ培地を交換した。

(Step 4)

Step 3 で得られた細胞 (Day 14) を 100 ng/ml FGF10 (Wako) を含有する基本培地 2 中で 7 日間培養した。この時、2 日に一度同じ条件の培地へ培地を交換した。

(Step 5)

培地交換後、Step 4 で得られた細胞 (Day 21) を 50 nM Dexamethasone (Sigma Aldrich)、 0.1 mM 8-Br-cAMP (Biological Life Science Institute)、 0.1 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Wako) および 100 ng/ml または 50 ng/ml KGF (Wako) を含有する基礎培地 3 (3.33% BSA Fraction V Solution (7.5%) (Life technologies)、 15 mM HEPES (Sigma Aldrich)、 0.8 mM CaCl_2 (Nacalaitesque)、1% ITS プレミックス (BD) および 0.5% Penicillin/streptomycin stock solution を含有する Ham's F12 media (Wako)) 中で培養し、以後 2 日に一度同じ条件の培地へ培地を交換した。4 日後 (Day 25)、得られた肺胞上皮前駆細胞について解析を行った。

<細胞解析>

(1) Step 3 終了後

Step 3 終了後 (Day 14) の細胞を免疫染色にて CPM および NKX2-1 の発現を確認したところ、これらのマーカーの共陽性細胞が確認された (図 2 A および B)。さらに、Day 14 の細胞から MACS (ミルテニー社) を用いて CPM 陽性細胞を採取し (図 3 A および B)、得られた細胞をサイトスピンにてスライドグラスに張り付けて、免疫染色を行ったところ、その多くが NKX2-1 も陽性であることが確認された (図 4 A および B)。この時の細胞をフローサイトメーターを用いて解析したところ、MACS により得られた CPM 陽性細胞のうち 92% の細胞が NKX2-1 陽性であることが確認された (図 5 A および B)。また、MACS により得られた CPM 陽性細胞を定量 RT-PCR を用いて CPM および NKX2-1 の mRNA 量を測定したところ、CPM 陽性細胞をソーティングすることで、顕著に CPM および NKX2-1 の mRNA 量が増加していることが確認された (図 6)。

(2) Step 4 終了後

Step 4 終了後 (Day 21) の細胞から MACS を用いて CPM 陽性細胞を採取し、定量 RT-PCR を用いて CPM および NKX2-1 の mRNA 量を測定したところ、CPM 陽性細胞をソーティングすることで、顕著に CPM および NKX2-1 の mRNA 量が増加していることが確認された (図 7)。

(3) Step 5 終了後

Step 5 終了後 (Day 25) の細胞から MACS を用いて CPM 陽性細胞を採取し、得られた細胞をサイトスピンにてスライドグラスに張り付けて、免疫染色を行ったところ、その多くが NKX2-1 も陽性であった (図 8 A)。さらに、SFTPC-reporter 201B7 を用いて同様に分化誘導した細胞についても免疫染色をおこなったところ、CPM 陽性細胞において SFTPC または proSPB 陽性の細胞が混在することが確認できた (図 8 B)。この SFTPC 陽性細胞の含有率をフローサイトメーターにより解析したところ、0.9% 程度であることが確認された (図 8 C)。

続いて、Step 5 終了後の Day 25 の細胞 (201B7) について免疫染色を行ったところ、CPM、NKX2-1、SFTPB、SFTPC および CCSP が陽性の細胞を確認した (図 9 A および B)。このとき、各マーカー遺伝子は、CPM と共陽性であることが確認できた。さらに MACS により得られた CPM 陽性細胞を定量 RT-PCR を用いて CPM、NKX2-1、SFTPA2、SFTPB、DCLAMP、SFTPC、

10

20

30

40

50

CCSPおよびNGFRのmRNA量を測定したところ、CPM陽性細胞をソーティングすることで、顕著にCPMおよびNKX2-1のmRNA量が増加していることが確認された(図10)。

以上より、本方法を用いることで、iPS細胞から肺上皮細胞またはその前駆細胞が誘導できることが確認された。

< CPMのマーカの効果 >

ヒト胎児由来の肺組織(図11)およびマウス胎児由来(E12.5、E15.5およびE17.5)の肺組織(図12)において、CPMの発現を確認したところNKX2-1、SFTPCおよびT1と共陽性であることが確認された。従って、CPMは、肺発生の管状期(ヒト:胎生16~24週、マウス:胎生16.5~17.5日)および腺様期(ヒト:胎生7~16週、マウス:胎生14.0~16.5日)のみならず胎生期(ヒト:胎生3~7週、マウス:胎生9~14日)といった初期の段階における肺胞上皮前駆細胞を認識できることが確認された。

以上より、CPMを指標とすることで肺胞上皮前駆細胞を認識し、抽出できることが確認された。

< 3次元培養 >

上述のSFTPC-reporter 201B7におけるStep3終了後に得られた細胞をMACSにて抽出したCPM陽性細胞 2×10^4 個を、 2×10^6 個のヒト胎児由来の肺線維芽細胞(DV Biologics: PP002-F-1349)と共に、マトリゲルと50nM Dexamethasone、0.1mM 8-Br-cAMP、0.1mM IBMXおよび10ng/ml KGFを含有する基礎培地3を1:1で混合した培地を400 μ lを加えた12wellのCell Culture Inserts(BD Biosciences)に移し、下層には、10 μ M Y-27632、50nM Dexamethasone、0.1mM 8-Br-cAMP、0.1mM IBMXおよび10ng/ml KGFを含有する基礎培地3を加えてスフェロイド(細胞塊)を形成し、10日から12日間培養した(図13)。得られたスフェロイドを透過電子顕微鏡で調べたところ、層状体様構造を有する細胞群となっていることが確認された(図14A)。

さらに、ヘマトキシリン-エオシン染色をおこなったところ、淡い色の細胞質を有するCPM(-)細胞由来のスフェロイドに比べ、CPM(+)細胞由来のスフェロイドではダークピンク色に染まる細胞質を有するシスト状(嚢胞状)の偽層状、円柱状、または立方状の細胞が観察された(図15A)。これらの細胞は、NKX2-1とCPMの両陽性細胞であり、さらにSFTPC陽性である細胞を含有していた(図15B)。このとき、I型肺胞上皮細胞マーカーであるAQP5の陽性細胞は、SFTPC陽性細胞と隣り合って存在することが確認された。

肺胞上皮細胞マーカーの発現を調べたところ、SFTPA、SFTPB、SFTPCおよびSFTPDが、CPMとNKX2-1陽性細胞において陽性であることが確認された(図16)。これらの遺伝子は、定量PCRにおいても3次元培養することでその発現が高くなることが確認された。さらに、いくつかのスフェロイド中のCPMおよびNKX2-1の陽性細胞には、末梢気道誘導の指標であるSOX9およびID2を発現しているものも見受けられた(図16)。

また、PDPNおよびCAV1は、スフェロイド周辺に存在する線維芽様細胞で陽性であった(arrow)が、スフェロイドにも発現していた(arrowheads)(図17)。

以上より、肺胞上皮細胞は、CPM陽性細胞から誘導できることが見出され、CPMは肺胞上皮細胞の前駆細胞のマーカーとして有用であることが示された。さらに、得られたCPM陽性細胞は、ヒト胎児由来の肺線維芽細胞との3次元共培養によって、成熟した肺胞上皮細胞へと誘導できることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0008】

10

20

30

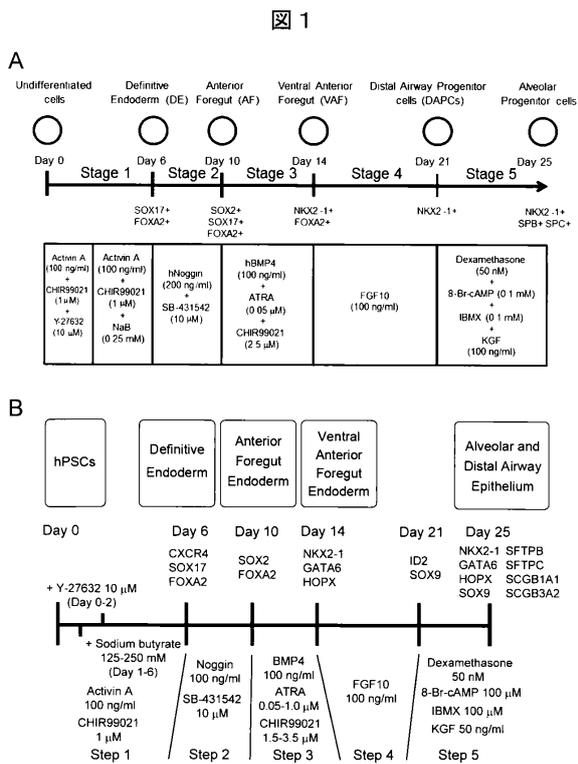
40

50

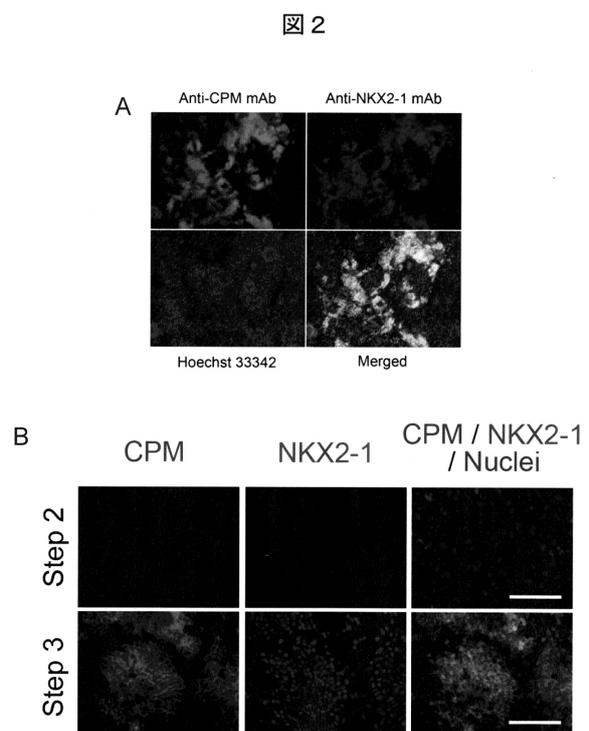
本発明に示す方法により、多能性幹細胞から肺胞上皮前駆細胞を製造することが可能となる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

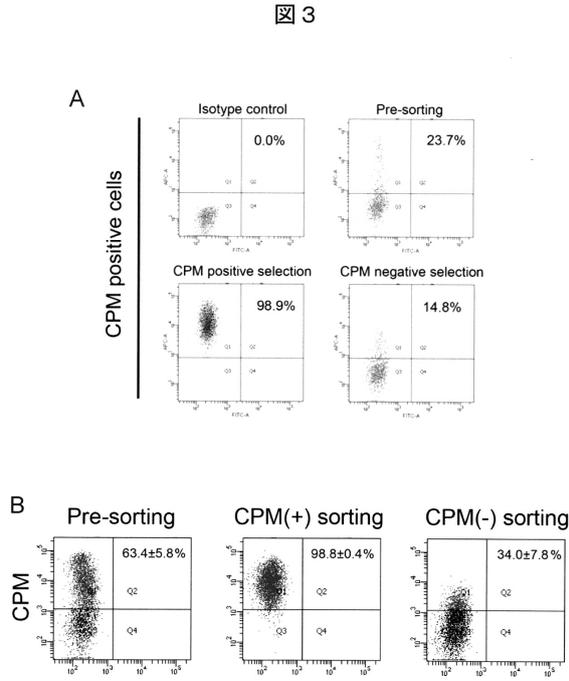
【 図 1 】



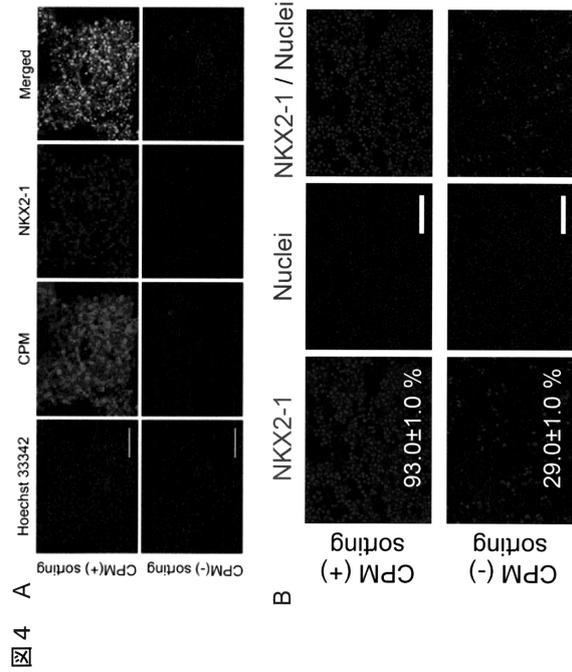
【 図 2 】



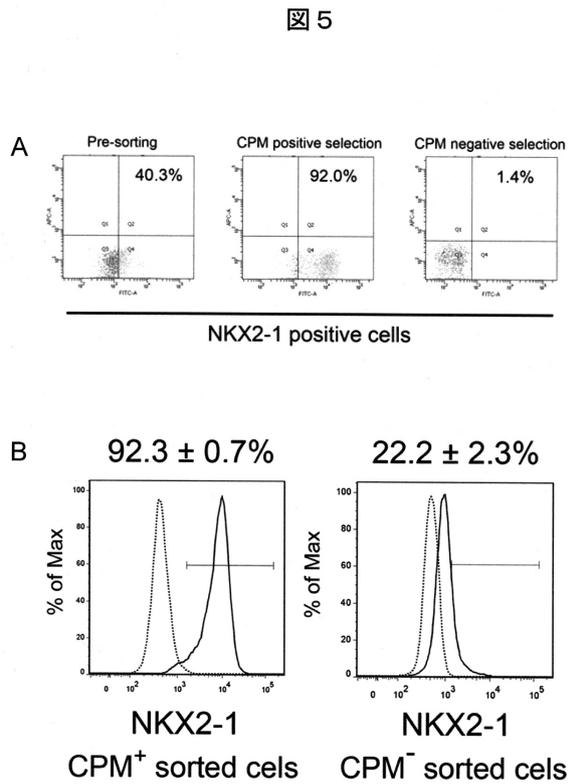
【 図 3 】



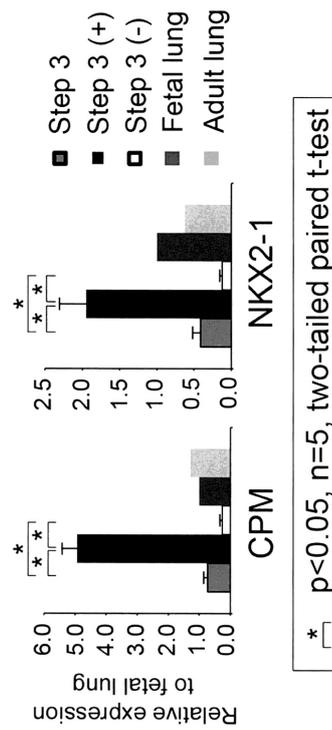
【 図 4 】



【 図 5 】

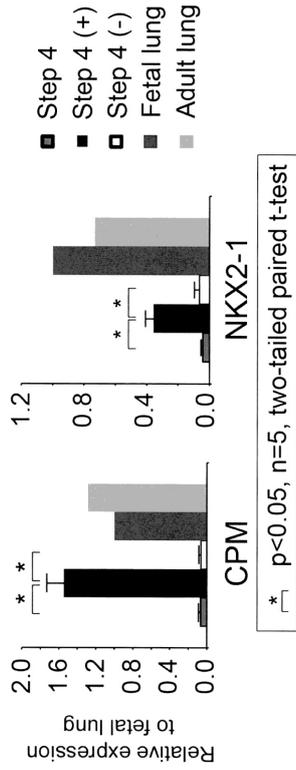


【 図 6 】



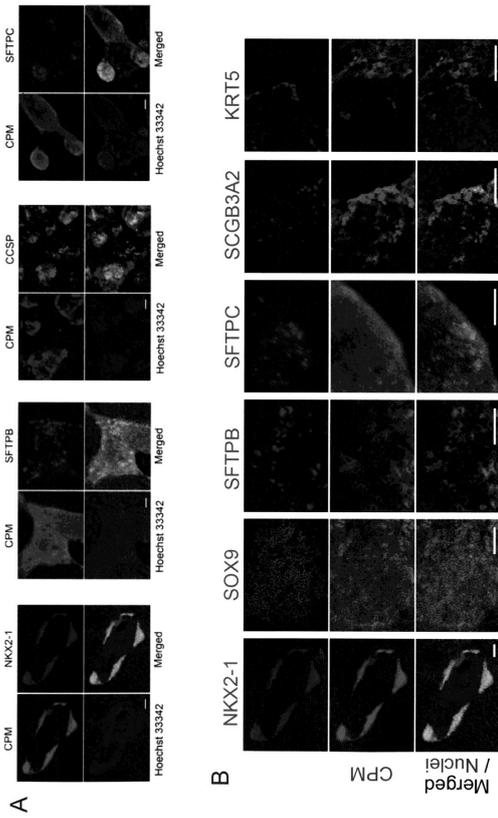
【 図 6 】

【 7 】



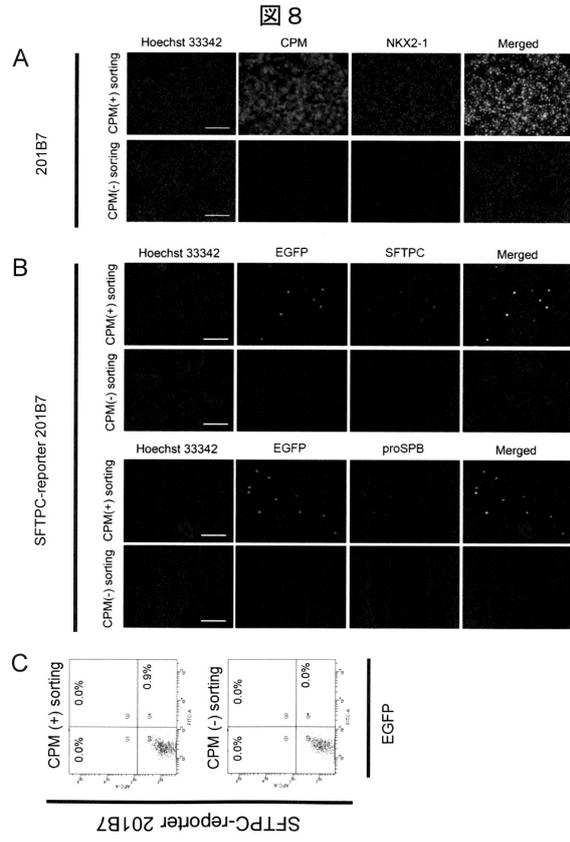
7

【 6 】



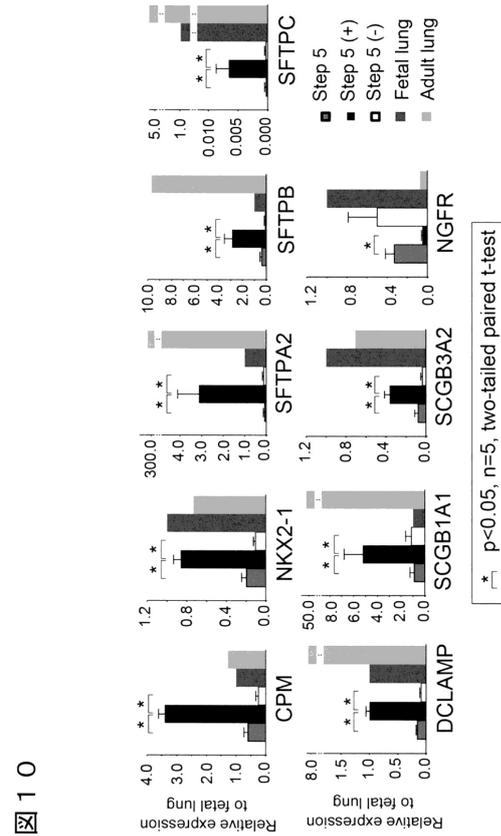
9

【 8 】



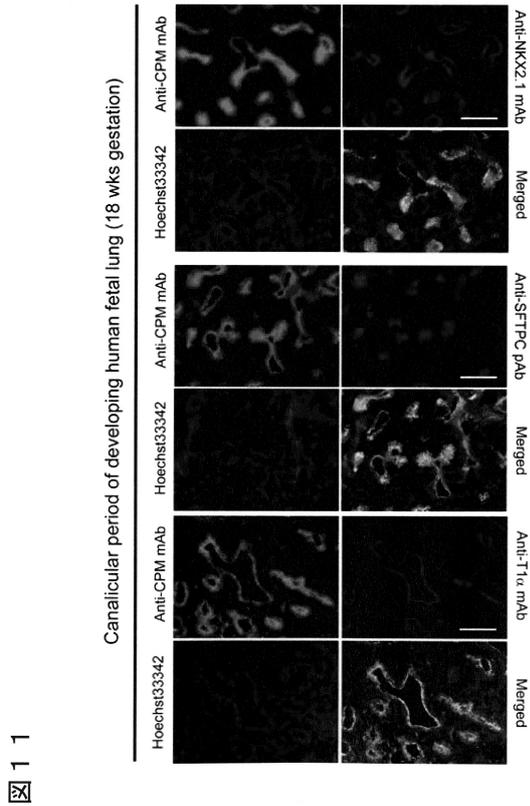
8

【 10 】



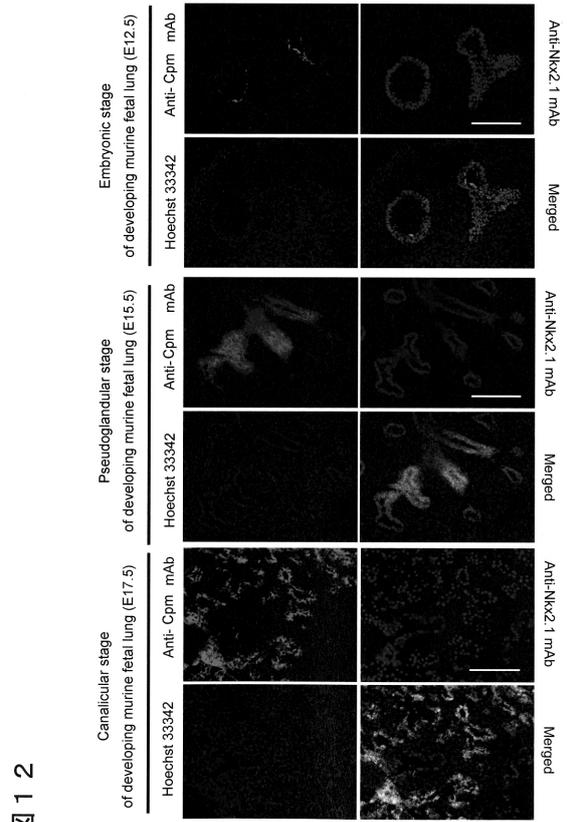
10

【 1 1 】



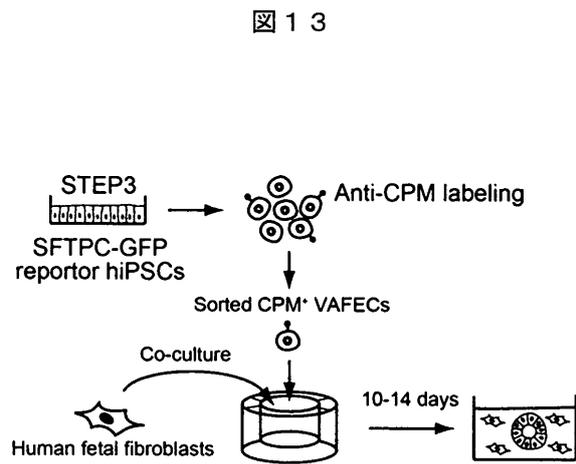
1 1

【 1 2 】



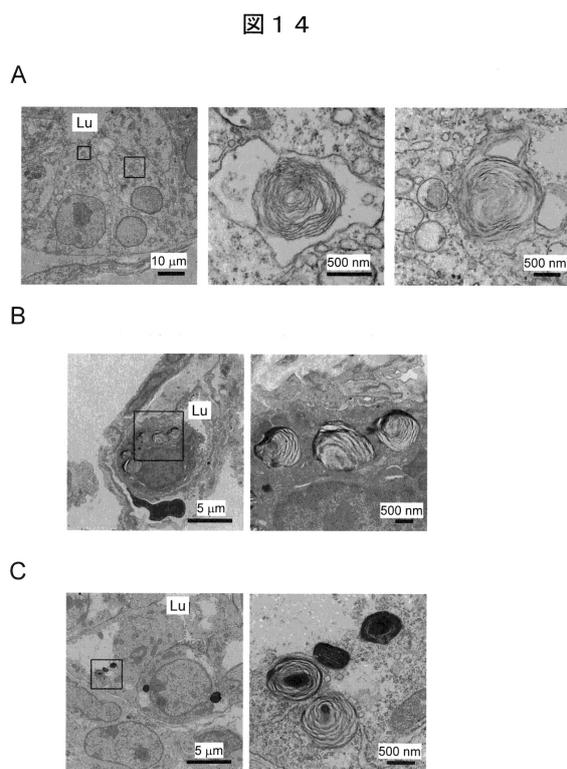
1 2

【 1 3 】

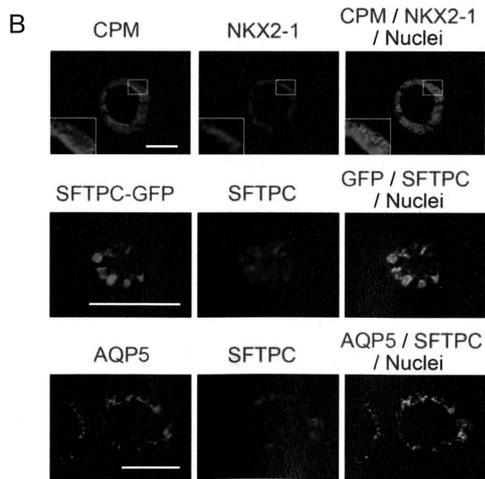
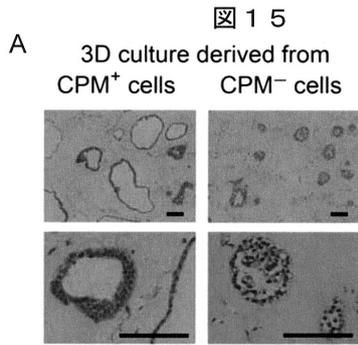


1 3

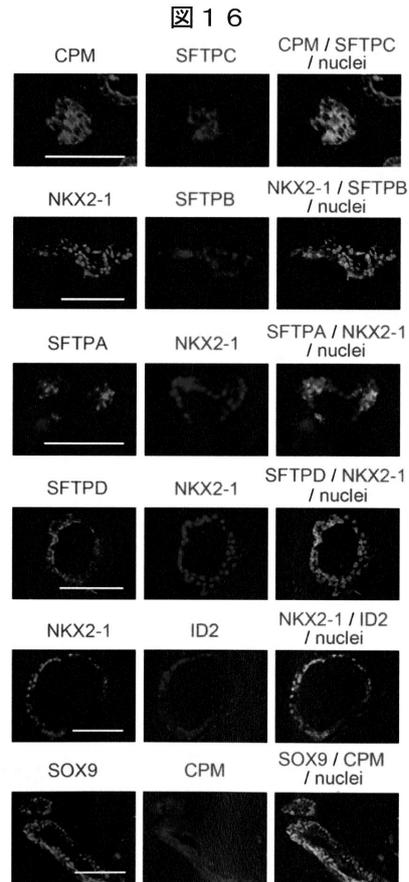
【 1 4 】



【 図 1 5 】

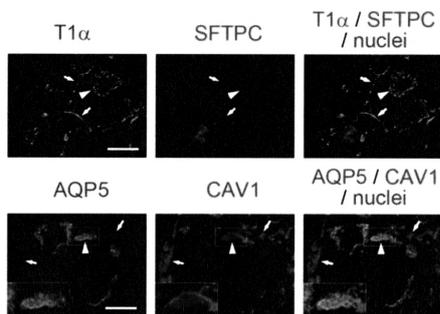


【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

図 1 7



フロントページの続き

- (72)発明者 伊藤 功朗
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 三嶋 理晃
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 SCHMECKEBIER S. et al., , Tissue Engineering. PartA, 2013.01.15, Vol.19, No.7-8, pp.938-951
LONGMIRE T. A. et al., , Cell Stem Cell, 2012, Vol.10, pp.398-411
GREEN M. D. et al., , Nature Biotechnology, 2011, Vol.29, No.3, pp.267-272
BONE H. K. et al., , Journal of Cell Science, 2011, Vol.124, No.12, pp.1992-2000
MOU H. et al., , Cell Stem Cell, 2012, Vol.10, pp.385-397
NORRMAN K. et al., , Methods, 2012.04.05, Vol.59, pp.59-70
WILLIAMS M. C., , Annual review of physiology. 2003, Vol.65, pp.669-695
HORALKOVA L. et al., , European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, Vol.36, pp.444-450
IKEDA M. et al., , Cell Structure and Function, 2004, Vol.29 Suppl., p.53, #1P-153
FUJIWARA N. et al., , Respiriology, 2007, Vol.12, pp.54-62

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 5/00

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)