

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関

国際事務局

(43) 国際公開日

2021年6月3日(03.06.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/106765 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/073 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)日本橋三丁目4番10号 アクロポリス
21ビル8階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2020/043328

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日:

2020年11月20日(20.11.2020)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2019-212446 2019年11月25日(25.11.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

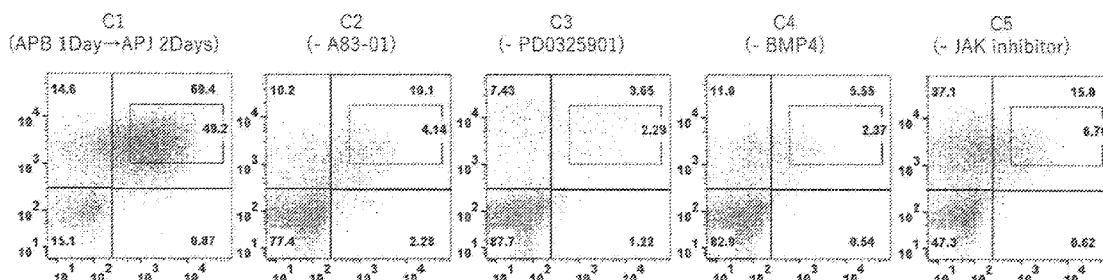
(72) 発明者: ▲ 高▼島 康弘 (TAKASHIMA, Yasuhiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 伊尾紳吾 (IO, Shingo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所(IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東

(54) Title: METHOD FOR INDUCING TROPHECTODERM FROM NAIVE PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称: ナイーブ型多能性幹細胞からの栄養外胚葉誘導方法

[図2]

(57) Abstract: This method produces trophectoderm in vitro and includes a step in which naive pluripotent stem cells are cultured in a culture medium and differentiation into trophectoderm is induced, said culture medium including at least two selected from the group consisting of a TGF β inhibitor, an MEK inhibitor, BMP, and a JAK inhibitor.(57) 要約: 栄養外胚葉をインビトロで製造する方法であって、ナイーブ型多能性幹細胞を、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種類以上を含む培地で培養して栄養外胚葉へ分化誘導する工程を含む方法。

添付公開書類 :

- 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：ナイーブ型多能性幹細胞からの栄養外胚葉誘導方法 技術分野

[0001] 本発明はナイーブ型多能性幹細胞からの栄養外胚葉誘導方法に関する。本発明はまた、ナイーブ型多能性幹細胞から栄養外胚葉を誘導するために使用される培地に関する。本発明はまた、栄養外胚葉を効率よく検出または分離するための分子マーカーに関する。本発明はまた、細胞性栄養膜細胞を効率よく検出または分離するための分子マーカーに関する。本発明はまた、羊膜細胞を効率よく検出または分離するための分子マーカーに関する。本発明はさらに、栄養外胚葉から細胞性栄養膜細胞、細胞性栄養膜幹細胞、合胞体栄養膜細胞、および、絨毛外栄養膜細胞を誘導する方法に関する。

背景技術

[0002] 受精卵は胎児成分と、胎児の成長を支える胚体外成分の大きく2つ成分に分かれて発生する。胚盤胞の段階で、胎児組織へ発生する胚盤葉上層と、胚体外組織となる胚盤葉下層・栄養外胚葉に分けることができる。胚盤葉下層は卵黄嚢へ、栄養外胚葉は胎盤へ発生する。

これらの発生プロセスを胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞により再現することは、発生メカニズムの解析、発生段階での疾患のメカニズム解明・治療等に有用である。しかしながら、ヒトのES細胞やiPS細胞に代表される多能性幹細胞はマウスの多能性幹細胞に比べ、発生が進んだプライム型に分類され、胚盤葉下層や栄養外胚葉への分化は困難であった。

[0003] そこで、本発明者一人である高島は、ヒトES細胞およびiPS細胞にNANOGとKLF2の2つの遺伝子を強制発現させることで、着床前の胚盤葉上層の段階にまでヒト多能性幹細胞をリセットした、ナイーブ型多能性幹細胞を得ることに成功した（非特許文献1）。胎児の初期発生に関しては、プライム型多能性幹細胞により分化制御メカニズムが明らかにされつつある。一方で、ヒ

ト胚体外組織、特に胎盤の初期発生の分化制御メカニズムは解明されていない。胎児に栄養や酸素を供給する胎盤は栄養膜細胞（トロホblast）が主要な成分で、細胞性栄養膜細胞、合胞体栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞の3つに大まかに分類される。生体における栄養膜細胞の発生は、受精卵表面の栄養外胚葉から始まる。栄養外胚葉は子宮内膜へ着床し、細胞性栄養膜細胞を経て、合胞体栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞へ終末分化する。全妊娠の25%は流産、胎児発育不全、妊娠高血圧症候群と呼ばれる妊娠合併症を発症し、これらの合併症の主要な原因は栄養膜細胞の機能不全、分化異常と考えられている。栄養外胚葉からこれらの栄養膜細胞への分化制御機構を明らかにし、分子生物学・細胞生物学的なアプローチで胎盤機能不全の原因に迫ることが注目されている。また、栄養外胚葉は固定、接着、浸潤という着床過程の全ての段階で非常に重要な役割を果たすが、着床前胚を用いた検討は使用可能な着床前胚の数に限りがあるだけではなく、倫理的にも制限されている。したがって、インビトロの栄養外胚葉への分化誘導は、これらの課題をクリアし、着床メカニズムの解明を明らかにし、生殖医療に福音をもたらすことが期待される。

[0004] インビトロで多能性幹細胞から栄養外胚葉や栄養膜細胞を分化誘導することが試みられている。例えば、プライム型ES細胞をBMP4で分化誘導することにより栄養膜細胞に分化させたという報告がある（非特許文献2，3）。しかしこれらの方法で得られる栄養膜細胞は生体内の栄養膜細胞とは全く異なるものであった。

また、非特許文献4では、expanded potential stem cells (EPSC) から栄養外胚葉を分化誘導したことが報告されているが、これも得られた栄養外胚葉は生体内栄養外胚葉とは全く異なるものであった。一方、非特許文献5では、ヒト胎盤およびヒト胚栄養外胚葉から栄養膜細胞（トロホblast）を誘導している。しかし、このような細胞はアクセスが制限され、実用的ではない。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1 : Takashima Y. et al., Cell 2014 158(6):1254-1269.
非特許文献2 : Xu et al., Nature Biotechnology 2002, Vol. 20 1261-1264
非特許文献3 : Amita et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2013, E1212-E1221
非特許文献4 : Gao et al., Nature Cell Biology 2019, Vol 21, 687-699
非特許文献5 : Okae et al., Cell Stem Cell 2018, vol 22; 50-63 e56.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は多能性幹細胞から栄養外胚葉を効率よく簡便な方法で誘導するための方法を提供することを課題とする。本発明はさらに、栄養外胚葉から細胞性栄養膜細胞、細胞性栄養膜幹細胞、合胞体栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞への分化を誘導し、栄養膜細胞の細胞系譜を明らかにすることを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、ナイーブ型多能性幹細胞を用い、これを、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上の因子を含む培地で培養することにより栄養外胚葉を効率よく誘導できることを見出した。また、TACSTD2 (Tumor Associated Calcium Signal Transducer 2)、ENPEP (Glutamyl Aminopeptidase) が栄養外胚葉および細胞性栄養膜細胞、SIGLEC6 (Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 6) が細胞性栄養膜細胞の特異的マーカーとして栄養外胚葉および細胞性栄養膜細胞、細胞性栄養膜幹細胞の選別や検出に効率よく使用できることを見出した。また、栄養外胚葉、細胞性栄養膜細胞および細胞性栄養膜幹細胞のマーカーとしてITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)、栄養外胚葉および細胞性栄養膜幹細胞のマーカーとしてHAVCR1(Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1)が、細胞性栄養膜細胞および細胞性栄養膜幹細胞のマーカーとしてITGB4(Integrin Subunit Beta 4)が、細胞性栄養膜幹細胞のマーカー

ーとしてITGA2(Integrin Subunit Alpha 2)が使用できることを見出した。また、羊膜細胞のマーカーとして、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMおよび／またはHEY1が使用できることを見出した。さらには、得られた栄養外胚葉をさらに分化誘導することにより細胞性栄養膜細胞、細胞性栄養膜幹細胞、さらには合胞体栄養膜細胞や絨毛外栄養膜細胞まで分化誘導できることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] 本発明は以下を提供する。

[1] 栄養外胚葉細胞をインビトロで製造する方法であって、ナイーブ型多能性幹細胞を、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上の因子を含む培地で培養して栄養外胚葉細胞へ分化誘導する工程を含む方法。

[2] 前記培地はTGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される3種以上の因子を含む、[1]に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。

[3] TGF β 阻害剤がA83-01であり、MEK阻害剤がPD0325901、BMPがBMP4、BMP2またはBMP6であり、JAK阻害剤がJAK inhibitor Iである、[1]または[2]に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。

[4] さらに、栄養外胚葉細胞をTACSTD2 (Tumor Associated Calcium Signaling Transducer 2)、ENPEP (Glutamyl Aminopeptidase)、ITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)および／またはHAVCR1(Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1)の発現を指標として純化する工程を含む、[1]～[3]のいずれかに記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。

[5] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[1]～[4]のいずれかに記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。

[6] 多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、[1]～[5]のいずれかに記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。

[7] [1]～[6]のいずれかに記載の方法で栄養外胚葉細胞を製造する工程、および、得られた栄養外胚葉細胞をTGF β 阻害剤、上皮成長因子(EGF)およびWntシグナル活性化剤を含む培地で培養して細胞性栄養膜細胞に分化誘

導する工程を含む、細胞性栄養膜細胞の製造方法。

[8] さらに、細胞性栄養膜細胞をTACSTD2、ENPEP、SIGLEC6 (Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 6)、Ki67 (MKI67(Marker Of Proliferation Ki-67))、ITGA2(Integrin Subunit Alpha 2)、ITGB4(Integrin Subunit Beta 4)、PTGES (Prostaglandin E Synthase)、HSD3B (Hydroxy-Delta-5-Steroid Delta-hydrogenase, 3 Beta-And Steroid Delta-Isomerase)、S100P (S100 Calcium Binding Protein P)、ITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)および／またはHAVCR1の発現を指標として純化する工程を含む、[7] の細胞性栄養膜細胞の製造方法。

[9] [7] または[8]に記載の方法で細胞性栄養膜細胞を調製する工程、および、得られた細胞性栄養膜細胞を培養して合胞体栄養膜細胞および／または絨毛外栄養膜細胞に分化誘導する工程を含む、合胞体栄養膜細胞および／または絨毛外栄養膜細胞の製造方法。

[10] 栄養外胚葉を提供する工程、および、当該栄養外胚葉を細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程を含む、細胞性栄養膜細胞の製造方法。

[11] 栄養外胚葉を細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程は、栄養外胚葉を、TGF β 阻害剤、上皮成長因子(EGF)およびWntシグナル活性化剤を含む培地で培養することにより、細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程である、[10]に記載の細胞性栄養膜細胞の製造方法。

[12] [1]～[6]のいずれかに記載の方法で調製された栄養外胚葉細胞。

[13] 栄養外胚葉細胞を含む細胞集団から栄養外胚葉細胞を分離する方法であって、TACSTD2、ENPEP、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として栄養外胚葉細胞を選別する工程を含む、方法。

[14] 栄養外胚葉細胞を含む細胞集団において栄養外胚葉細胞を検出する方法であって、TACSTD2、ENPEP、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として栄養外胚葉細胞を検出する工程を含む、方法。

[15] TACSTD2に特異的に結合する分子、ENPEPに特異的に結合する分子、I

TGA6に特異的に結合する分子および／またはHAVCR1に特異的に結合する分子を含む、栄養外胚葉細胞の検出または選別用試薬。

[16] TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上の因子を含む、栄養外胚葉細胞分化誘導用ナイーブ型多能性幹細胞培地。

[17] TGF β 阻害剤がA83-01であり、MEK阻害剤がPD0325901、BMPがBMP4、BMP2またはBMP6であり、JAK阻害剤がJAK inhibitor Iである、[16]に記載のナイーブ型多能性幹細胞用培地。

[18] 細胞性栄養膜細胞を含む細胞集団から細胞性栄養膜細胞を分離する方法であって、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を選別する工程を含む、方法。

[19] 細胞性栄養膜細胞を含む細胞集団から細胞性栄養膜細胞を検出する方法であって、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を検出する工程を含む、方法。

[20] TACSTD2に特異的に結合する分子、ENPEPに特異的に結合する分子、SIGLEC6に特異的に結合する分子、ITGA2に特異的に結合する分子、ITGB4に特異的に結合する分子、PTGESに特異的に結合する分子、HSD3Bに特異的に結合する分子、S100Pに特異的に結合する分子、ITGA6に特異的に結合する分子および／またはHAVCR1に特異的に結合する分子を含む、細胞性栄養膜細胞の検出または選別用試薬。

[21] 羊膜細胞を含む細胞集団から羊膜細胞を分離する方法であって、TNC(Tenascin C)、CDH10(Cadherin 10)、PKDCC(Protein Kinase Domain Containing, Cytoplasmic)、GABRP(Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Pi)、IGFBP5(Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5)、POSTN(Periostin)、VTCN1(V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1)、VIM(Vimentin)および／またはHEY1(Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1)の発現を指標として細胞性栄養膜細

胞を選別する工程を含む、方法。

[22] 羊膜細胞を含む細胞集団から羊膜細胞を検出する方法であって、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMおよび／またはHEY1の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を検出する工程を含む、方法。

[23] TNCに特異的に結合する分子、CDH10に特異的に結合する分子、PKDCCに特異的に結合する分子、GABRPに特異的に結合する分子、IGFBP5に特異的に結合する分子、POSTNに特異的に結合する分子、VTCN1に特異的に結合する分子、VIMに特異的に結合する分子および／またはHEY1に特異的に結合する分子を含む、羊膜細胞検出または選別用試薬。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、遺伝子の強制発現を伴うことなく、培養操作のみで簡便に多能性幹細胞から栄養外胚葉を誘導することができる。さらには、栄養外胚葉を細胞性栄養膜細胞に分化誘導することができ、自己複製能と分化能を有した細胞性栄養膜幹細胞を維持培養することができる。さらには栄養膜細胞の終末分化段階とされる合胞体栄養膜細胞と絨毛外栄養膜細胞にまで分化誘導することができる。本発明の方法は従来のプライム型多能性幹細胞では困難であった胚体外細胞である栄養外胚葉への分化誘導を簡便な手順で実現したものであり、多能性幹細胞を用いて機能的な成熟した細胞や組織を誘導するための基盤技術となりうる画期的な方法である。本発明の方法は発生メカニズムの解明、再生医療、発生段階での疾患のメカニズム解明・治療などに有用である。また、本発明の分子マーカーを用いた栄養外胚葉の選別・検出方法は、栄養外胚葉細胞を選択的に選別・検出できるため、有用である。また、本発明の分子マーカーを用いた細胞性栄養膜細胞の選別・検出方法は、細胞性栄養膜細胞を選択的に選別・検出できるため、有用である。また、本発明の分子マーカーを用いた羊膜細胞の選別・検出方法は、羊膜細胞を選択的に選別・検出できるため、有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ナイーブ型多能性幹細胞を各条件で培養したときのTACSTD2、ENPEP両陽

性細胞の割合を示すグラフ～1。

[図2]ナイーブ型多能性幹細胞を各条件で培養したときのTACSTD2抗体およびENPEP抗体を用いたフローサイトメトリーの結果を示す図。縦軸がTACSTD2、横軸がENPEPを示す。

[図3]ナイーブ型多能性幹細胞をC1条件で培養して得られた細胞の顕微鏡写真。

[図4]ナイーブ型多能性幹細胞を各条件で培養したときのTACSTD2、ENPEP両陽性細胞の割合を示すグラフ～2。

[図5]ナイーブ型多能性幹細胞をC1条件で培養して得られた細胞における栄養外胚葉マーカー (KRT19、TFAP2C、GATA3、CDX2、TACSTD2) の発現を調べた免疫染色の結果を示す図 (顕微鏡写真)。

[図6]ナイーブ型ES細胞またはプライム型ES細胞を培養して得られた細胞におけるHLA-A, Bの発現を調べた結果を示す図。「BMP-Treated Primed ESCs」はプライム型ES細胞を非特許文献3の方法で分化誘導した細胞であり、「Primed ESCs」はプライム型ES細胞であり、「9week Placenta」はインビボの胎盤であり、「Cytotrophoblast-like cells」が本発明の方法で分化誘導した細胞栄養膜細胞であり、「Trophectoderm-like cells」が本発明の方法で分化誘導した栄養外胚葉細胞であり、「Naive ESC cells」はナイーブES細胞であり、Controlはnegative control (unstain)である。

[図7]ナイーブ型多能性幹細胞をC1条件で培養して得られた細胞を、さらに培養して得られた細胞性栄養膜細胞における栄養膜細胞マーカー (GATA3、TFAP2C、KRT7) の発現を調べた免疫染色の結果を示す図 (顕微鏡写真)。

[図8]ナイーブ型ES細胞を培養して得られた細胞における第19番染色体マイクロRNAの発現を調べた結果を示す図。JARは第19番染色体マイクロRNAの発現レベルの指標として用いられる緜毛癌細胞株である。

[図9]ナイーブ型ES細胞またはプライム型ES細胞を培養して得られた細胞におけるELF5プロモーターにおけるメチル化状態を調べた結果を示す図。ELF5-2bプロモーター領域のバイサルファイトシーケンシング結果。1ドナーに対して

、CpG領域を少なくとも8クローン以上解析した。ELF5-2b転写開始点からの位置を数値で表している。脱メチル化を白丸、メチル化を黒丸で示す。百分率はメチル化率を示す。

[図10]妊娠5週及び妊娠11週のヒト絨毛膜絨毛における、Ki-67の発現を調べた免疫染色の結果を示す図（顕微鏡写真）。スケールバーは100 μmを示す。

[図11]ナイーブ型ES細胞を培養して得られた栄養外胚葉細胞をさらに培養して得られた細胞性栄養膜細胞の形態を示す顕微鏡写真と、当該細胞性栄養膜細胞における各種マーカーの発現を調べた結果を示す図。

[図12]ナイーブ型ES細胞を培養して得られた栄養外胚葉細胞をさらに培養して得られた細胞性栄養膜細胞における、細胞性栄養膜マーカー（Ki-67）の発現を調べた免疫染色の結果を示す図。スケールバーは100 μmを示す。

[図13]細胞性栄養膜細胞をさらに培養して得られた合胞体栄養膜細胞の形態を示す顕微鏡写真と、当該合胞体栄養膜細胞における細胞癒合とHuman chorionic gonadotropin (hCG) の発現を調べた結果を示す図。

[図14]細胞性栄養膜細胞をさらに培養して得られた絨毛外栄養膜細胞の形態を示す顕微鏡写真と、当該絨毛外栄養膜細胞におけるHLA-GとLVRN(Laeverin)の発現を調べた結果を示す図。

[図15]TE様細胞と細胞性栄養膜（CT）幹細胞におけるマーカー発現をフローサイトメトリーで調べた結果を示す図～その1。

[図16]TE様細胞と細胞性栄養膜（CT）幹細胞におけるマーカー発現をフローサイトメトリーで調べた結果を示す図～その2。

[図17]細胞性栄養膜（CT）幹細胞及び、プライム型多能性幹細胞から誘導された細胞（pBAP）における、CTマーカー（PTGES、HSD3B）の発現を調べた免疫染色の結果を示す図（顕微鏡写真）。スケールバーは100 μmを示す。

[図18]TE、CTおよびpBAPにおけるHAVCR1、S100P、ITGA6、ITGA2及びSIGLEC6の遺伝子発現を定量RT-PCRによって調べた結果を示すグラフ。

[図19]妊娠5週のヒト絨毛膜絨毛における、TE及び／又はCTマーカーの発現

を調べた免疫染色の結果を示す図（顕微鏡写真）。スケールバーは100 μmを示す。

[図20]プライム型多能性幹細胞から誘導された細胞（pBAP）における、TE及び／又はCTマーカーの発現をフローサイトメトリーで調べた結果を示す図。

[図21]本発明の方法で得られたTE又はCTと、プライム型多能性幹細胞から誘導された細胞（pBAP）との、カニクイザル羊膜における発現変動遺伝子の発現量を比較した結果を示す図。

[図22]本発明の方法で得られたTE及びCTと、プライム型多能性幹細胞から誘導された細胞（pBAP）における、ヒトの羊膜で顕著に発現する遺伝子の発現量を比較した図。

[図23]本発明の方法で得られたTE及びCTと、プライム型多能性幹細胞から誘導された細胞（pBAP）における、羊膜細胞マーカー遺伝子の発現量を定量RT-PCRで調べた結果を示す図。

[図24]本発明の方法で得られたCTと、プライム型多能性幹細胞から誘導された細胞（pBAP）における、VTCN1の発現をフローサイトメトリーで調べた結果を示す図。

[図25]本発明の方法で得られたTE、CT、ST及びEVTにおける、各ステージに特異的な遺伝子の発現を比較した結果を示す図。

[図26]本発明の方法で得られたCTを長期間維持培養し、細胞数の累積を示した図。

[図27]本発明の方法で得られたCTを長期間維持培養し、分化させたS T及びE V Tのマーカー発現量を、定量RT-PCRで調べた結果を示す図。

[図28]本発明の方法で得られたCTを用いて形成させたオルガノイドの形態を顕微鏡写真で示す図。スケールバーは100 μmを示す。

[図29]本発明の方法で得られたCTを用いて形成させたオルガノイドにおける、栄養膜細胞マーカー及びSTマーカーの発現量を定量RT-PCRで調べた結果を示す図。

[図30]本発明の方法で得られたCTを用いて形成させたオルガノイドにおける

、栄養膜細胞マーカーの発現を調べた免疫染色の結果を示す図（顕微鏡写真）。スケールバーは100 μmを示す。

発明を実施するための形態

[0011] <栄養外胚葉細胞の製造方法>

本発明の栄養外胚葉細胞をインビトロで製造する方法は、ナイーブ型多能性幹細胞を、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上（好ましくは3種、より好ましくは4種）の因子を含む培地で培養して栄養外胚葉細胞へ分化誘導する工程、を含む。

TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から2種選択する場合、これらの組み合わせのうち任意の2種でよいが、TGF β 阻害剤とMEK阻害剤であることが好ましい。

TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から3種選択する場合、これらの組み合わせのうち任意の3種でよいが、TGF β 阻害剤とMEK阻害剤とBMPであることが好ましい。

[0012] <多能性幹細胞>

本発明において多能性幹細胞とは、生体に存在する多く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、栄養外胚葉に誘導される任意の細胞が含まれる。多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹（iPS）細胞、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」）、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。好ましい多能性幹細胞は、iPS細胞およびES細胞である。多能性幹細胞の由来は哺乳動物由来であることが好ましく、靈長類由来であることがより好ましく、ヒト由来であることがさらに好ましい。

[0013] iPS細胞の製造方法は当該分野で公知であり、任意の体細胞へ初期化因子を導入することなどによって製造され得る。ここで、初期化因子とは、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、 Sall1、 Sall4、 Esrrb、 Nr5A2、 Tbx3またはGlis1等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、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、 W02007/069666、 W02008/118820、 W02009/007852、 W02009/032194、 W02009/058413、 W02009/057831、 W02009/075119、 W02009/079007、 W02009/091659、 W02009/101084、 W02009/101407、 W02009/102983、 W02009/114949、 W02009/117439、 W02009/126250、 W02009/126251、 W02009/126655、 W02009/157593、 W02010/009015、 W02010/033906、 W02010/033920、 W02010/042800、 W02010/050626、 W02010/056831、 W02010/068955、 W02010/098419、 W02010/102267、 W02010/111409、 W02010/111422、 W02010/115050、 W02010/124290、 W02010/147395、 W02010/147612、 Huangfu D, et al. (2008) , Nat. Biotechnol. , 26:795-797、 Shi Y, et al. (2008) , Cell Stem Cell, 2:525-528、 Eminli S, et 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. Biotechnol. , 27:459-461、 Lysiottis 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. 463:1096-100、 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。

[0014] 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）血液細胞（末梢血細胞、臍帯血細胞等）、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、臍細胞（臍外分泌細胞等）、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。

[0015] <ナイーブ型多能性幹細胞>

ナイーブ (naive) 型多能性幹細胞は、着床前胚に類似した性質を持つ多能性幹細胞であるが、具体的には、以下のような特徴を有する (Cytometry Research 27 (1) : 19 ~ 24, 2017)。

ドーム型のコロニー形態を示し、コロニーの大きさはプライム型より小さい。

マーカーとして、CD75、KLF4、KLF17およびTFCP2L1の1つ以上を発現する。

ゲノムが脱メチル化されている。

[0016] ナイーブ型多能性幹細胞は、例えば、下記のような方法によって作成することができる。

NANOGとKLF2の過剰発現を用いる方法(Takashima et al., Cell 158 : 1254 -1269, 2014)

5i/L/Aコンディションを用いる方法(Theunissen et al., Cell Stem Cell. 2016 Oct 6;19(4):502-515.)

HDAC（ヒストンデアセチラーゼ）阻害剤を用いる方法 (Guo, G. et al. (2017). Development 144(15): 2748-2763.)

また、t2iLGo(Ndiff227[Takara Bio, Cat. Y40002]、NaiveCult Induction Kit[STEMCELL Technologies, Cat. ST-05580]や、NaiveCult Expansion Medium [STEMCELL Technologies, Cat. ST-05590]など、市販のナイーブ型多能性幹細胞調製用培地を用いて、プライム型多能性幹細胞を培養することにより得ることもできる。

[0017] <プライム型多能性幹細胞>

プライム (primed) 型多能性幹細胞は着床後胚のエピブラストに類似した性質を持つ多能性幹細胞であるが、体細胞に初期化因子を導入して得られる一般的な人工多能性幹細胞やヒトES細胞がこれに該当し、上記のようなナイーブ化処理をされていないものである。

プライム型多能性幹細胞は以下のようないくつかの特徴を有する。

平坦なコロニー形態を示し、コロニーの大きさはナイーブ型より大きい。

マーカーとして、CD75、KLF4、KLF17、SUSD2およびTFCP2L1は陰性であり、CD57、CD24が陽性である。

ゲノムがメチル化されている。

[0018] <TGF β 阻害剤>

TGF β 阻害剤とは、TGF β 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（アクチビン受容体様キナーゼ）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が挙げられ、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、SB202190(以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、SB-525334、GW6604、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A83-01(WO 2009146408) およびこれらの誘導体などが例示される。TGF β 阻害剤は、好ましくは、A83-01である。

培養液に含まれるTGF β 阻害剤の濃度としては、TGF β 阻害剤の種類に応じてTGF β 阻害効果を発揮する濃度を適宜選択することができ、例えば、A83-01を用いる場合、通常0.1～100 μ Mの範囲内であり、好ましくは0.5～20 μ M、より好ましくは1～5 μ Mである。

[0019] <MEK阻害剤>

MEK阻害剤は、Raf／MEK／ERKシグナル伝達経路 (MAPK経路) に存在するリン酸化酵素MEK (マイトジエン活性化蛋白質 (MAP) キナーゼ／細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) キナーゼ) の働きを阻害することで、MAPK経路を遮断

することが知られている物質である。

MEK阻害剤としては、例えば、トラメチニブ (Trametinib) 、コビメチニブ (cobimetinib) 、セルメチニブ (Selumetinib) 、レファメティニブ (Refametinib) 、ピマセルチブ (Pimasertib) 、U0126、MEK162／ARRY-162、AZD8330／ARRY-424704、GDC-0973／RG7420、GDC-0623／RG7421／XL518、CIF／RG7167／R04987655、CK127／RG7304／R05126766、E6201、TAK-733、PD0325901、AS703988／MSC2015103B、WX-554、CI-1040／PD184352、AS703026、PD318088、PD98059、SL327、並びにこれらの薬学的に許容される塩及び溶媒和物が挙げられる。MEK阻害剤は好ましくはPD0325901である。

MEK阻害剤の使用濃度は特に制限されず、各阻害剤の種類に応じたMEK阻害濃度を適宜設定できるが、例えば、PD0325901を用いる場合、通常0.1～100 μMの範囲内であり、好ましくは0.5～20 μM、より好ましくは1～5 μMである。

[0020] <BMP>

BMPは、BMP2、BMP4およびBMP6から成る群より選択される少なくとも一つのBMPが挙げられるが、好ましくは、BMP4である。BMPは哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることが好ましい。ヒトBMP4としては、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセスション番号：NP#001193のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。BMPは所望の分化誘導活性を有する限りその断片及び機能的改変体が含まれる。BMPは市販されているものを使用してもよいし、細胞から精製されたタンパク質や遺伝子組み換えで生産されたタンパク質を使用してもよい。培養液に含まれるBMPの濃度は、0.1ng/ml～1000ng/ml、好ましくは、1ng/ml～200ng/ml、より好ましくは、5ng/ml～50ng/mlである。

[0021] <JAK阻害剤>

JAK阻害剤はJanus kinaseを阻害するものであれば特に制限されないが、例えば、JAK Inhibitor I (CAS-457081-03-7) 、トファシチニブ(CP-690550)、ルキソリチニブ、バリシチニブ、INCB039110、オクラシチニブ、AZD1480、フェデラチニブ(SAR302503, TG101348)、AT9283、AG-490、モメロチニブ、WP10

66、TG101209、ガンドチニブ(LY2784544)、NVP-BSK805、AZ960、CEP-33779、パクリチニブ(SB1518)、WHI-P154、XL019、S-ルキソリチニブ、ZM39923、デセルノチニブ(VX-509)、セルデュラチニブ(PRT062070, PRT2070)、フィルゴチニブ(GLPG0634)、FLLL32、FM-381、BMS-911543、イタシチニブ(INCB39110)、ペフィシチニブ(ASP015K, JNJ-54781532)、GLPG0634、GLPG0634アナログ、Go6976、クルクモール、ククルビタシン、レスタウルチニブ、ウパダシチニブ(ABT-494)、WHI-P258、PF-06700841、PF-04965842、PF-06651600、FLLL32、WHI-P97、CHZ868、ソルシチニブ(GSK2586184)、NS-018、またはこれらの誘導体が挙げられる。また、JAK阻害剤は米国特許第2002/0019526号に記載されたものを使用することもできる。JAK阻害剤の使用濃度は特に制限されず、各阻害剤の種類に応じたJAK阻害濃度を適宜設定できるが、例えば、JAK Inhibitor Iを用いる場合、通常0.05～50 μMの範囲内であり、好ましくは0.1～10 μM、より好ましくは0.5～5 μMである。

[0022] 栄養外胚葉誘導工程において用いられる培養液は、特に限定されないが、ナイーブ型多能性幹細胞維持培地に、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上（好ましくは3種類以上、さらに好ましくは4種類）を添加して調製することができる。なお、これらの因子は時期をずらして添加してもよい。例えば、JAK阻害剤は誘導開始から24時間後に添加することもできる。また、BMPは誘導開始から24時間までの添加に留めることもできる。

なお、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上に加えて、後述のWntシグナル活性化剤(CHIR99021など)を添加することもできる。

[0023] ナイーブ型多能性幹細胞維持培地としては、例えば、以下のような培地が使用できる。

· t2iLGo

N2B27 + PD0325901(1 μM) + CHIR99021(1 μM) + LIF(10 ng/ml) + Go6983(2-3 μM)

Takashima et al., Cell 158 : 1254-1269, 2014

· 5i/L/A

N2B27 +PD0325901(1 μM) +CHIR99021(1 μM) +SB590885 (0.5 μM) +WH-4-023
(1 μM) +Y-27632(10 μM) +LIF(10 ng/ml)+Activin A(20 ng/ml)

Theunissen, T. W., et al. (2014). Cell Stem Cell 15(4): 471-487.

· tt2iLc +iWNT

N2B27 +PD0325901(1 μM) +LIF(10 ng/ml) + Go6983(2 μM) +XAV939(2 μM)

Guo, G., et al. (2017). Development 144(15): 2748-2763.

[0024] 培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよいし血清代替物を使用してもよい。必要に応じて、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、脂質、アミノ酸、L-グルタミン酸、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得る。培地はさらに、ROCK阻害剤を含んでいてもよい。ROCK阻害剤は、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ないが、例えば、Y-27632が使用され得る。

[0025] 栄養外胚葉誘導工程において、ナイーブ型多能性幹細胞を接着培養または浮遊培養してもよい。

接着培養の場合、培養容器をコーティングして用いてもよく、またフィーダー細胞等と共に培養してもよい。共培養するフィーダー細胞としては、マイトマイシンC処理済のマウス胎仔由来の初代線維芽細胞 (MEF)、STO細胞、SNT細胞、OP9細胞またはC3H10T1/2細胞等が挙げられる。

[0026] 栄養外胚葉誘導工程において、接着培養が行われる場合、細胞外基質をコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行うことができる。コーティング処理は、細胞外基質を含有する溶液を培養容器に入れた後、当該溶液を適宜除くことによって行い得る。ここで、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、ポリリジン、ポリオルニチン、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および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(商標)などの細胞からの調製物であってもよい。

[0027] 栄養外胚葉誘導工程において、浮遊培養によって培養が行われる場合、細胞を培養容器へ非接着の状態で凝集体（スフェアとも言う）を形成させて培養することが望ましく、このような培養は、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）、非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）またはリン脂質類似構造物（例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする水溶性ポリマー（Lipidure）によるコーティング処理した培養容器を使用することによって行うことができる。

[0028] 栄養外胚葉誘導工程における、ナイーブ型多能性幹細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37°C～約39°C程度が好ましい。栄養外胚葉誘導工程における、ナイーブ型多能性幹細胞を培養する際の培養酸素条件は、特に限定されず通常の酸素濃度でもよいが、例えば、約2%～約8%程度、約4%～約6%程度の低酸素条件が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は栄養外胚葉が得られる限り特に限定されないが、例えば、少なくとも1日間以上、好ましくは2～5日である。

[0029] <栄養外胚葉>

上記のような培養工程を行うことにより栄養外胚葉を得ることができる。

栄養外胚葉は、GATA2(GATA Binding Protein 2)、GATA3(GATA Binding Protein 3)、CDX2 (Caudal Type Homeobox 2)、DAB2(Disabled Homolog 2)、PTGE

S(Prostaglandin E Synthase)、TFAP2C(Transcription Factor AP-2 Gamma)、KRT19(Keratin 19)、ABCG2(ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2)などの栄養外胚葉マーカーの1種類以上の発現により特徴づけられる。また、これら1種類以上のマーカーに加えて後述のTACSTD2およびENPEPを発現する細胞であることがより好ましい。さらに、ITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)およびHAVCR1(Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1)を発現する細胞であることがより好ましい。栄養外胚葉は、通常OCT4(Octamer-Binding Protein 4)、NANOG(Nanog Homeobox)、VIM(Vimentin)、SIGLEC6(Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 6)が陰性である。栄養外胚葉細胞はHLA-A、HLA-Bが陰性であることによっても特徴づけられる。栄養外胚葉細胞はまた、JAR、BeWo、JEGなどの絨毛癌細胞株と比較して、19番染色体マイクロRNAクラスターのマイクロRNA発現量が同等、またはそれ以上であるという特徴も有する。加えて、ELF5プロモーターの脱メチル化率が高いという特徴も有する。

[0030] 栄養外胚葉細胞を濃縮するためには、栄養外胚葉誘導工程を行った後に、栄養外胚葉を選別する工程を行うこともできる。選別は上記のような栄養外胚葉特異的なマーカーの1種類以上の発現を指標として行うことができる。栄養外胚葉マーカーを用いて栄養外胚葉細胞を抽出する際には、各マーカータンパク質が発現していることを指標にしてもよいし、上記各マーカータンパク質をコードする遺伝子が発現(mRNAが発現)していることを指標にしてもよい。

[0031] 栄養外胚葉細胞を含有する細胞集団より栄養外胚葉細胞の選別（抽出または検出の場合も同様）を行うために使用される試薬としては、上記栄養外胚葉マーカーに特異的に結合する分子であれば何でもよく、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。また、これらのマーカーの遺伝子発現を調べる場合は、これらのマーカー遺伝子にハイブリダイズするプライマーやプローブを使用することができる。

[0032] 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。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等で発現し精製したマーカータンパク質、あるいは部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、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) Published. John Wiley and Sons. Section 11.4-11.11)。抗体の断片としては、抗体の一部(例えば、Fab断片)または合成抗体断片(例えば、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。マーカーが膜タンパク質である場合、細胞外ドメインに対する抗体であることが好ましい。抗体は市販の抗体を用いててもよい。

- [0033] 結合した細胞を区別、分離するため、当該親和性を有する抗体等の試薬は、例えば、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識、酵素、ビオチン、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、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。
- [0034] 栄養外胚葉細胞を選別(抽出または検出の場合も同様)する方法には、例えば、フローサイトメーターを用いる方法が挙げられる。また、担体に結合させた抗体を用いて沈降させる方法、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)、蛍光標識を用いて細胞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。
- [0035] <TACSTD2および／またはENPEPの発現を指標とした栄養外胚葉細胞の選別または検出方法>

本発明者らによりTACSTD2およびENPEPがナイーブ型多能性幹細胞由来栄養

外胚葉のマーカーとして好適に使用できることが見出されたため、本発明は、栄養外胚葉細胞を含む細胞集団から栄養外胚葉細胞を選別（分離）又は検出する方法であって、TACSTD2および／またはENPEPを用いて栄養外胚葉細胞を選別（分離）又は検出する工程を含む、方法を提供する。例えば、上述したように、TACSTD2および／またはENPEPに対する抗体を用いて栄養外胚葉細胞をこれらマーカーの陽性細胞として選別（分離）又は検出することができる。

なお、TACSTD2はWntシグナルを制御して上皮細胞の増殖や幹細胞の自己複製を活性化させるタンパク質であり（参考文献：Stoyanova T et al., Genes Dev. 2012; Vol. 26:2271–2285）、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセスション番号：NM#002353のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

ENPEP（アミノペプチダーゼA）はエンドペプチダーゼの一つで、レニン-アンジオテンシン系のアンジオテンシンIIをアンジオテンシンIIIに分解する機能を有するタンパク質であり（参考文献：Holmes RS et al., J Data Mining Genomics Proteomics. 2017; Vol. 8:2）、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセスション番号：NM#001977のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

[0036] 本発明において、「栄養外胚葉細胞を含有する細胞集団」とは、栄養外胚葉細胞を含有している細胞の集合体であれば、その由来は特に問わないが、ナイーブ型多能性幹細胞（好ましくはヒトナイーブ型多能性幹細胞）から栄養外胚葉への分化誘導により得られた栄養外胚葉細胞を含有する細胞集団であることが好ましい。

[0037] 本発明において、「栄養外胚葉細胞の選別（分離）」とは、選別（分離）前と比して栄養外胚葉細胞の割合を多くすることを意味し、好ましくは、栄養外胚葉細胞を50%、60%、70%、80%または90%以上含有するよう濃縮されることである。より好ましくは、100%栄養外胚葉細胞からなる細胞を得ることである。

[0038] TACSTD2および／またはENPEPの発現を指標として栄養外胚葉細胞を含有する細胞集団から栄養外胚葉細胞を選別（分離）する場合、上記のGATA2、GATA3、DAB2、CDX2等の栄養外胚葉マーカーと組み合わせて使用してもよい。さらに、ITGA6およびHAVCR1と組み合わせて使用してもよい。これにより、TACSTD2および／またはENPEPを指標として使用する場合と比較して栄養外胚葉の濃縮率は高められる。

なお、ITGA2はコラーゲンやラミニンに結合するタンパク質であり（参考文献：Rubel D et al., Matrix Biol. 2014;Vol. 34:13-21）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#002194のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

HAVCR1はT細胞の活性化に関与するとともに、A型肝炎ウィルスやエボラウイルスの受容体として関与する膜タンパク質であり（参考文献：Moller-Tank S et al., J Virol. 2014;Vol. 88:6702-6713）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#036338のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

[0039] なお、マーカーが陽性である細胞を選択的に選別（分離）することは、マーカーが陽性である細胞を全て選別（分離）することでもよいが、マーカーの発現量が一定量以上の細胞を選別（分離）することでもよい。例えば、栄養外胚葉を含有する細胞集団において、マーカーの発現量が上位50%以内の細胞、上位40%以内の細胞、上位33%以内の細胞、上位30%以内の細胞、上位20%以内の細胞、または上位10%以内の細胞を選択的に収集することとすることができる。

[0040] <TACSTD2および／またはENPEPの発現を指標とした栄養外胚葉細胞の選別または検出のための試薬>

本発明はまた、TACSTD2に特異的に結合する分子および／またはENPEPに特異的に結合する分子を含む、栄養外胚葉細胞の選別または検出のための試薬を提供する。TACSTD2やENPEPに特異的に結合する分子としては、上記したおりであり、TACSTD2またはENPEPに対する抗体やTACSTD2遺伝子またはENPEP遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドなどが挙げられる。栄養外胚

葉細胞の選別または検出のための試薬は、TACSTD2またはENPEPに特異的に結合する分子と共に、当該検出試薬の使用方法を記載した指示書を含むこともできる。栄養外胚葉細胞の選別または検出のための試薬は、ITGA6および／またはHAVCR1に特異的に結合する分子を含んでもよい。

[0041] <栄養外胚葉への分化誘導のための培地>

本発明はまた、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上（好ましくは3種類以上、より好ましくは4種類）の因子を含む栄養外胚葉への分化誘導のためのナイーブ型多能性幹細胞用培地を提供する。これらは、各成分が栄養外胚葉への分化誘導のために有効な濃度で含まれるよう予め調製された培地でもよいし、使用直前に各成分を添加することで調製して使用されるものでもよい。なお、これらの因子は時期をずらして添加してもよい。例えば、JAK阻害剤は誘導開始から24時間後に添加することもできる。また、BMPは誘導開始に添加し、誘導24時間までに添加を終了することができる。したがって、いくつかの因子は別に提供されてもよい。培地（キット）には使用法や調製法を記載した取扱説明書が添付されていてもよい。栄養外胚葉への分化誘導のための培地は、ナイーブ型多能性幹細胞の培養に必要な他の成分をさらに含むことができる。

[0042] <細胞性栄養膜細胞の調製方法>

本発明はまた、栄養外胚葉をTGF β 阻害剤、上皮成長因子(EGF)およびWntシグナル活性化剤を含む培地で培養して細胞性栄養膜細胞まで分化させる工程を含む、細胞性栄養膜細胞の調製方法を提供する。

栄養外胚葉は上記のような方法で得られたものでもよいし、他の方法により得られるものでもよい。

[0043] TGF β 阻害剤は栄養外胚葉の製造におけるものと同様のもの（例えば、A83-01）を使用することができ、その好ましい濃度も同様である。

[0044] <Wntシグナル活性化剤>

Wntシグナル活性化剤は特に制限されないが、Wntタンパク質、GSK3 β 阻害剤などが挙げられる。Wntシグナル活性化剤はW02007/126077にも開示されて

いる。

GSK3 β 阻害剤とは、GSK-3 β タンパク質のキナーゼ活性（例えば、 β 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、例えば、インジルビン誘導体であるBIO（別名、GSK-3 β 阻害剤IX；6-ブロモインジルビン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)-1H-ピロール-2,5-ジオン）、フェニル α ブロモメチルケトン化合物であるGSK-3 β 阻害剤VII（4-ジブロモアセトフェノン）、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mtsおよびCHIR99021(6-[2-[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)pyrimidin-2-ylamino] ethylamino]pyridine-3-carbonitrile)が挙げられる。本発明で使用されるWntシグナル活性化剤としてのGSK-3 β 阻害剤は、好ましくは、CHIR99021であり得る。

培養液中におけるGSK3 β 阻害剤の濃度は、例えば、CHIR99021を用いる場合、通常0.05～50 μ Mの範囲内であり、好ましくは0.1～10 μ M、より好ましくは0.5～5 μ Mである。

[0045] <EGF>

EGFは哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることが好ましい。ヒトEGFとしては、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセスション番号：NP#001954のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。EGFは所望の分化誘導活性を有する限りその断片及び機能的改変体が含まれる。EGFは市販されているものを使用してもよいし、細胞から精製されたタンパク質や遺伝子組み換えで生産されたタンパク質を使用してもよい。培養液に含まれるEGFの濃度は、0.1ng/ml～1000ng/ml、好ましくは、1ng/ml～500ng/ml、より好ましくは、10ng/ml～200ng/mlである。

[0046] 細胞性栄養膜細胞の分化誘導に用いる培地は、上述したようなナイーブ型多能性幹細胞維持培地にTGF β 阻害剤、Wntシグナル活性化剤およびEGFを添加し、さらに血清代替物やROCK阻害剤などを添加したもの用いることができる。細胞性栄養膜細胞の分化誘導は接着培養または浮遊培養してもよい。接

着培養の場合は、上述の細胞外基質をコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行うことができる。

[0047] 細胞性栄養膜細胞分化誘導工程における、栄養外胚葉細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37°C～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は細胞性栄養膜細胞が得られる限り特に限定されないが、例えば、少なくとも1日間以上、好ましくは2～12日である。

なお、細胞性栄養膜細胞は継代培養後も未分化の状態が維持されており、自己複製能と分化能を維持した状態で、長期間、例えば、6ヶ月以上維持できる。細胞は2～4日毎にAccutase(Sigma-Aldrich, Cat. A6964)、または、TrypLE Express(ThermoFisher Scientific, Cat. 12604021)を用い剥離し継代できる。新たに継代培養する播種細胞数は、培養皿等から前記の方法などで剥離・回収した細胞数に対して、1：2～1：4となるように行なうことが望ましい。細胞播種の際は、TGF β 阻害剤、Wntシグナル活性化剤およびEGFを含む細胞性栄養膜細胞の維持培地に10 μ M Y-27632を加えることが好ましい。

このように、自己複製能と分化能を維持した細胞性栄養膜細胞を細胞性栄養膜幹細胞と呼ぶが、本明細書においては、特に断らない限り、細胞性栄養膜細胞という用語は細胞性栄養膜幹細胞も含む。

[0048] 細胞性栄養膜細胞は、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGB4、および、ITGA6が陽性、CDX2が陰性、OCT4が陰性、NANOGが陰性であることによって特徴づけられる。増殖能の高い細胞性栄養膜細胞は、加えてITGA2および／またはHAVCR1が陽性である。細胞性栄養膜細胞は、Ki67、PTGES、HSD3B、S100Pのいずれか1種以上が陽性であってもよい。したがって、細胞性栄養膜細胞はTACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、Ki67、ITGB4、ITGA6、PTGES、HSD3BおよびS100Pの1つ以上のマーカーの発現を指標にして検出、分離、選別又は抽出することができる。また、細胞性栄養膜幹細胞はTACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、Ki67、ITGA2、ITGB4、HAVCR1、ITGA6、PTGES、HSD3BおよびS100Pの1つ以上のマーカーの発現を指

標にして検出、分離又は抽出することができる。

[0049] 本発明はまた、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6またはHAVCR1に特異的に結合する分子の1つ以上を含む、細胞性栄養膜細胞の選別または検出のための試薬を提供する。TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6またはHAVCR1に特異的に結合する分子としては、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6またはHAVCR1のタンパク質に対する抗体や、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6またはHAVCR1の遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドなどが挙げられる。細胞性栄養膜細胞の選別または検出のための試薬は、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6またはHAVCR1に特異的に結合する分子と共に、当該検出試薬の使用方法を記載した指示書を含むこともできる。

[0050] SIGLEC6はレプチン依存性に細胞増殖や浸潤を調節するタンパク質であり（参考文献：Rumer KK et al., Endocr Relat Cancer. 2012;Vol. 19:827-840）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#001236のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

ITGB4は構造接着分子の一つで、ITGA6等とともにヘテロ二量体を形成する。Rho GTPアーゼ、MAPキナーゼ、NK-κBシグナルの活性化に関与するタンパク質であり（参考文献：Han L et al., J Neuroinflammation. 2018;Vol. 15:246）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#001005731のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

ITGA6は構造接着分子の一つで、ITGB4等とともにヘテロ二量体を形成する。細胞接着や遊走に関わるタンパク質であり（参考文献：Hu T et al., Sci Rep. 2016;Vol. 6:33376）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#001073286のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

Ki67は細胞周期に関連するタンパク質であり、（参考文献：Brown DC et al., Histopathology. 2002;Vol. 40:2-11）、例えば、NCBIのアクセッション

番号：NP#001139438のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

PTGESはプロスタグランジンE合成酵素であり、炎症によって増加するタンパク質である（参考文献：Zhao FQ et al., Cell Stress Chaperones. 2013; Vol. 18:773-783）。例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#004869のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

HSD3Bは3beta水酸化ステロイド脱水素酵素と呼ばれ、ステロイド産生に関するタンパク質であり（参考文献：Majdic G et al., Biol Reprod. 1998; Vol. 58:520-525）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#000853のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

S100PはEFハンド型カルシウム結合ドメインを有するタンパク質であり、ErkシグナルやNK- κ Bシグナルの活性化にて細胞増殖に関する（参考文献：Arumugam T et al., J Biol Chem. 2004; Vol. 279:5059-5065）。例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#005971のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

[0051] <合胞体栄養膜細胞の調製方法>

上記のようにして得られた細胞性栄養膜細胞を培養することで合胞体栄養膜細胞を得ることができる。

合胞体栄養膜細胞は細胞性栄養膜細胞をForskolinなどのcAMP増強剤を含む培地、好ましくはさらにEGFを含む培地で培養することにより得ることができる。例えば、Forskolinを用いる場合、その濃度は通常0.05～50 μ Mの範囲内であり、好ましくは0.1～10 μ M、より好ましくは0.5～5 μ Mである。

培地はさらに、ROCK阻害剤と血清代替物を含むことが好ましい。合胞体栄養膜細胞への分化誘導は接着培養または浮遊培養してもよい。接着培養の場合は、上述の細胞外基質をコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行うことができる。

[0052] 合胞体栄養膜細胞分化誘導工程における、細胞性栄養膜細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37°C～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細

胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は合胞体栄養膜細胞が得られる限り特に限定されないが、例えば、少なくとも1日間以上、好ましくは2～10日である。

[0053] 合胞体栄養膜細胞はそのマーカー分子であるCGA(Glycoprotein Hormones, Alpha Polypeptide)、CGB5 (Chorionic Gonadotropin Subunit Beta 5)、CSH1(Chorionic Somatomammotropin Hormone 1)、SDC1(Syndecan 1；CD138)等の発現により同定されうる。したがって、合胞体栄養膜細胞はこれら1つ以上のマーカーの発現を指標にして検出、分離又は抽出することができる。

[0054] <絨毛外栄養膜細胞の調製方法>

絨毛外栄養膜細胞は上記細胞性栄養膜細胞をTGF β 阻害剤およびNeuregulin 1を含む培地で培養することにより得ることができる。

TGF β 阻害剤は栄養外胚葉の製造におけるものと同様のもの（例えば、A83-01）を使用することができ、濃度は通常0.1～100 μ Mの範囲内であり、好ましくは1～20 μ M、より好ましくは5～10 μ Mである。

Neuregulin 1は哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることが好ましい。ヒトNeuregulin 1としては、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセスション番号：NP#001153467のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。Neuregulin 1は所望の分化誘導活性を有する限りその断片及び機能的改変体が含まれる。Neuregulin 1は市販されているものを使用してもよいし、細胞から精製されたタンパク質や遺伝子組み換えで生産されたタンパク質を使用してもよい。培養液に含まれるNeuregulin 1の濃度は、0.1ng/ml～1000ng/ml、好ましくは、1ng/ml～500ng/ml、より好ましくは、10ng/ml～200ng/mlである。

培地はさらに、ROCK阻害剤と血清代替物、さらにはMatrigelや、Geltrexなどの細胞外基質を含むことが好ましい。添加する細胞外基質としてMatrigelを選択する場合、培養液に対するMatrigelの添加は、0.1%～10%、好ましくは、0.3%～5%、より好ましくは、0.5%～3%である。添加する細胞外基質としてGeltrexを選択する場合、培養液に対するGeltrexの添加は、0.1%～10%

%、好ましくは、0.3%～5%、より好ましくは、0.5%～3%である。絨毛外栄養膜細胞への分化誘導は、接着培養または浮遊培養してもよい。接着培養の場合は、上述の細胞外基質をコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行うことができる。

[0055] 絨毛外栄養膜細胞分化誘導工程における、細胞性栄養膜細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37℃～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は絨毛外栄養膜細胞が得られる限り特に限定されないが、例えば、少なくとも1日間以上、好ましくは2～10日である。

[0056] また、絨毛外栄養膜細胞マーカー分子であるHLA-G、MCAM(Melanoma Cell Adhesion Molecule ; CD146)等の発現により同定されうる。したがって、絨毛外栄養膜細胞はこれら1つ以上のマーカーの発現を指標にして検出、分離又は抽出することができる。

[0057] <羊膜細胞の選別または検出のための方法および試薬>

羊膜細胞は、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMおよびHEY1の1種以上が陽性であることによって特徴づけられる。したがって、羊膜細胞はTNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMおよびHEY1の1つ以上のマーカーの発現を指標にして検出、分離、選別又は抽出することができる。また、羊膜細胞はTNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMおよびHEY1の1つ以上のマーカーの発現を指標にして検出、分離又は抽出することができる。

本発明はまた、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMまたはHEY1に特異的に結合する分子の1種以上を含む、羊膜細胞の選別または検出のための試薬を提供する。TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMまたはHEY1に特異的に結合する分子としては、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMまたはHEY1のタンパク質に対する抗体やTNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMまたはHEY1の遺伝子

にハイブリダイズするポリヌクレオチドなどが挙げられる。羊膜細胞の選別または検出のための試薬は、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMまたはHEY1に特異的に結合する分子と共に、当該検出試薬の使用方法を記載した指示書を含むこともできる。

[0058] TNCは胚発生や形態形成に関する細胞外マトリックスの巨大な糖タンパク質であり（参考文献：Chiquet-Ehrismann R et al., Cell. 1986;Vol. 47:131-139）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#002151のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

CDH10は大脳新皮質における興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランスを司るタンパク質であり（参考文献：Smith KR et al., J Neurosci. 2017;Vol. 37:11127-11139）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#001304151のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

PKDCCはWntシグナルの制御に関わる蛋白キナーゼであり（参考文献：Vitorino M et al., Plos One. 2015;Vol. 10:e0135504）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#612379のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

GABRPはマクロファージ浸潤に関わるタンパク質であり（参考文献：Jiang SH et al., Gut. 2019;Vol. 68:1994-2006）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#001278914のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

IGFBP5は細胞増殖と遊走を制御するタンパク質であり（参考文献：Akkipri k M et al., BMC Cancer. 2009;Vol. 9:103）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#000590のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

POSTNは細胞増殖と遊走を制御するタンパク質であり（参考文献：Tang Y et al., Cell Prolif. 2017;Vol. 50:e12369）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#006466のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

VTCN1は免疫チェックポイント関連タンパク質であり（参考文献：Guo M et al., EMBO Mol Med. 2017;Vol. 9:462-481）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#078902のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

VIMは細胞の動的機能調節や遊走に関わるタンパク質であり（参考文献：Ba

ttaglia RA et al., F1000Res. 2018;Vol. 7:F1000 Faculty Rev-1796)、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#003371のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

HEY1はNotchシグナルの下流で細胞分化を制御するタンパク質であり（参考文献：Nakahara Y et al., Genes Cells. 2016;Vol. 21:492-504）、例えば、NCBIのアクセッション番号：NP#001035798のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

実施例

[0059] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施態様には限定されない。

[0060] Material and method

Cell culture

ヒトプライム型多能性幹細胞(PSC)ライン(H9ES(胚性幹)細胞、409B2細胞、201B7細胞)はConventional condition(F12/KSRと呼ぶ)(Dulbecco's modified Eagle medium [DMEM/F12; ナカライトスク, Cat. 08460-95]、20%[v/v] KSR [Thermo Fisher Scientific, Cat. 10828028]、nonessential amino acids [NEAA; Thermo Fisher Scientific, Cat. 11140-050]、4 ng/ml recombinant human bFGF [bFGF; オリエンタル酵母, Cat. NIB 47079000]、0.1 mM 2-mercaptoethanol [Sigma-Aldrich, Cat. M3148])を用い、 γ 線照射したMEF上で維持した。細胞は4～6日毎にDissociation Buffer(DB; 0.025% Trypsin [Thermo Fisher Scientific, Cat. 15090-046]、1mg/ml Collagenase IV [Thermo Fisher Scientific, Cat. 17104-019]、20% KSR、1mM CaCl₂)を用い、小さなクランプ様に剥離し継代した。

[0061] ヒトナイーブ型多能性幹細胞ライン(H9ES細胞、409B2細胞、201B7細胞由来)はt2iLGo(Ndiff227[Takara Bio, Cat. Y40002]、1 μ M PD0325901 [PD03; Tocris, Cat. 4192]、1 μ M CHIR99021[CH; Sigma-Aldrich, Cat. SML1046]、10 ng/ml Recombinant human LIF [human LIF; Peprotech, Cat. 300-05]、3 μ M Go6983[Go; Tocris, Cat. 2285])を用いMEF上で維持した。細胞は3～5日毎に

Accutase(Sigma-Aldrich, Cat. A6964)を用い剥離し継代した。

- [0062] ナイーブ型H9ES細胞およびナイーブ型409B2細胞は、5i/L/Aコンディションを用いる方法で樹立した(Theunissen et al., Cell Stem Cell. 2014 Oct 2; 15(4):471-487.)。プライム型H9細胞または/及び409B2細胞をトリプシン/EDTAにより単一な細胞へと剥離し、 1×10^5 個/cm²の細胞を $10 \mu\text{M}$ Y-27632を加えたF12/KSR培地でMEF上へと播種した。翌日から5i/L/A培地(Ndiff, $1 \mu\text{M}$ PD03, $1 \mu\text{M}$ CH, $1 \mu\text{M}$ WH-4-023[A Chemtek H620061], $0.5 \mu\text{M}$ SB590885[R and D 2650], $10 \mu\text{M}$ Y-27632, 10ng/ml human LIF, 20ng/ml Activin A[R&D, Cat. 388-AC])に変更し培養を続けた。大半の細胞がドーム状の形態を示すコロニーを形成した時点で(4-6継代)、t2iLGoへと切り替え維持することで樹立した。
- [0063] ナイーブ型201B7細胞の樹立は、NANOGとKLF2の過剰発現を用いた方法で樹立した(Takashima et al., Cell 158 : 1254-1269, 2014)。doxycyclineにより過剰発現を誘導することのできるプラスミドをエレクトロポレーションし、プライム型201B7細胞へと導入した(201B7 NK2)。プラスミドには薬剤耐性マーカーとなる遺伝子(ネオマイシン耐性)を組み込み、細胞への導入後、Geneticin(Thermo Fisher Scientific, Cat. 10131035)を用いて薬剤選択を行うことにより、プラスミドの導入された細胞を選抜した。プライム型201B7 NK2をトリプシン/EDTAにより単一な細胞へと剥離し、 1×10^5 個/cm²の細胞を $10 \mu\text{M}$ Y-27632(Wako, Cat. 034-24024)を加えたF12/KSR培地でMEF上へと播種した。翌日(day1)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline hyclate(Dox; Sigma-Aldrich, Cat. D 9891)を加えた。Day2から2iL($1 \mu\text{M}$ PD03, $1 \mu\text{M}$ CH, LIF)+Dox培地に切り替え、約1週間培養する。その後、t2iLGoへと切り替え維持することで樹立した。

[0064] 栄養外胚葉(TE)誘導

MEF上で培養しているナイーブ型多能性幹細胞をAccutaseにより剥離させ回収した後に、ゼラチンコートディッシュに播種し、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632(ROCK阻害剤)を加えたt2iLGoで37°C、2時間培養しMEFを取り除いた。その後、各々の誘導培地で再懸濁し、播種と同時に誘導を開始する。

[0065] 化合物を用いて誘導する場合には、12ウェルディッシュにiMatrix-511 silk (Nippi, Cat. 892021)をコーティングし、 1.5×10^5 個/ cm^2 の細胞を播種した。

誘導培地にはNdiff227培地を使用し、各種化合物を表2または3に記載の条件で添加し、培養を行って、栄養外胚葉分化を誘導する化合物をスクリーニングした。

なお、TGF β 阻害剤としてはA83-01を、MEK阻害剤としてはPD0325901を、BMPとしてはBMP4を、JAK阻害剤としてはJAK inhibitor Iを用いた。

[0066] また、得られた栄養外胚葉細胞の評価および細胞性栄養膜細胞以降への誘導に際しては、以下の条件でナイーブ型iPS細胞を培養して得られた栄養外胚葉細胞を用いた。

誘導培地にはNdiff227培地に $2 \mu\text{M}$ A83-01(Tocris, Cat. 2939)、 $2 \mu\text{M}$ PD0325901(Tocris, Cat. 4192)、10ng recombinant human BMP-4 (BMP-4; R&D, Cat. 314-BP)を加えたものを使用した。誘導開始24時間に生理食塩水でディッシュを洗浄した後、Ndiff227培地に $2 \mu\text{M}$ A83-01(Tocris, Cat. 2939)、 $2 \mu\text{M}$ PD0325901、 $1 \mu\text{M}$ JAK inhibitor(MERCK)を加えたものを誘導開始72時間まで使用した。

[0067] FACS analysis / sorting

栄養外胚葉細胞、細胞性栄養膜細胞、細胞性栄養膜幹細胞、ナイーブ型多能性幹細胞はAccutaseにより、単一な細胞へと剥離し回収した。回収した細胞集塊にNdiff227培地を加え、30分37°Cでインキュベートした。その後、1% BSA(Sigma-Aldrich, Cat. A2153)を加えたHBSS(Thermo Fisher Scientific, Cat. 14185052)を用いブロッキングを氷上にて30分行った。Biotinylated抗TACSTD2抗体(Miltenyi biotec, Cat. 130-115-054)、PE-conjugated抗ENPEP抗体(Thermo Fisher Scientific, Cat. 12-5891-82)を加え、氷上にて30分間インキュベートした。洗浄後、Streptavidin-APC(Biolegend, Cat. 405207)を加え、氷上にて30分間インキュベートした。FACS解析にはBD LSR Fortessa (BD)、sortingにはFACS AriaII(BD)を用いた。また、データ解析にはFlow Jo V10.2 softwareを用いた。

[0068] 栄養外胚葉から細胞性栄養膜細胞 (CT) への誘導

栄養外胚葉に誘導し3日目の細胞を抗TACSTD2抗体および抗ENPEP抗体を用いて陽性細胞をフローサイトメトリーで純化した。その後、Ndiff227培地に $1\mu M$ A83-01、50 ng/ml EGF、 $2\mu M$ CHIR99021を加え、iMatrix511 silk上で培養を継続した。細胞播種時には、 $10\mu M$ Y-27632(ROCK阻害剤)を培地に添加した。12日目にフローサイトメトリーで細胞性栄養膜細胞を純化した。フローサイトメトリーによる純化には、Alexa-Fluor488-conjugated抗TACSTD2抗体 (R&D, Cat# FAB650G)、PE-conjugated抗ENPEP抗体、およびBiotinylated抗SIGLEC6抗体 (Miltenyi biotec, Cat. 130-112-708) を加え、氷上にて30分間インキュベートした。洗浄後、Streptavidin-APC(Biolegend, Cat. 405207)を加え、氷上にて30分間インキュベートした。FACS解析にはBD LSR Fortessa(BD)、sortingにはFACS AriaII(BD)を用いた。また、データ解析にはFlow Jo V 10.2 softwareを用いた。

[0069] なお、12日目にフローサイトメトリーで純化した細胞性栄養膜細胞をNdiff 227培地に $1\mu M$ A83-01、50 ng/ml EGF、 $2\mu M$ CHIR99021を加え、iMatrix511 silk上で培養を継続した。細胞播種時には、 $10\mu M$ Y-27632(ROCK阻害剤)を培地に添加した。これにより、自己複製能、分化能を有した細胞性栄養膜幹細胞として6ヶ月以上維持培養することが可能であった。

[0070] 細胞性栄養膜幹細胞から合胞体栄養膜細胞 (ST) への誘導

上記で純化された細胞性栄養膜幹細胞を4% KSR(knockout serum replacement)、 $2\mu M$ Forskolin、 $2.5\mu M$ Y-27632(ROCK阻害剤)を含むメディウム(DMEM/F12)を用いて、iMatrix511 silk上で6日間培養した。

[0071] 細胞性栄養膜幹細胞から絨毛外栄養膜細胞 (EVT) への誘導

上記で純化された細胞性栄養膜幹細胞を4% KSR(knockout serum replacement)、 $7.5\mu M$ A83-01、100 ng/ml Neuregulin1、 $2.5\mu M$ Y-27632(ROCK阻害剤)、Matrigelを含むメディウム(DMEM/F12)を用いて、iMatrix511 silk上で3日間培養した (Day1～Day3)。続いて、4% KSR(knockout serum replacement)、 $7.5\mu M$ A83-01、 $2.5\mu M$ Y-27632(ROCK阻害剤)、Matrigel(またはGeltrex

)のメディアに交換し、3日間培養した (Day4～Day6)。さらに、 $7.5 \mu\text{M}$ A83-01、 $2.5 \mu\text{M}$ Y-27632(ROCK阻害剤)、Matrigel(またはGeltrex)のメディアに交換し、2日間培養した (Day7～Day8)。

[0072] Reverse Transcription Quantitive Real-time PCR

total RNAはRNeasy kit(Qiagen, Cat. 74106)にて抽出し、1000ngのRNAからcDNAをSuperScriptIV(Thermo Fisher Scientific, Cat. 18090050)とoligo-dTプライマーを用い合成した。Real-time PCRにはPowerUP Sybr Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific, Cat. A25743)を用い、PCR増幅にはQuantStudio3(Thermo Fisher Scientific)またはQuantStudio12Kを用いた。Real-time RT-PCR反応後の解析はQuantStudio Design&Analysis Software v1.4.1を用いて行った。

[0073] Immunostaining

細胞を室温で10分間4% paraformaldehyde(ナカライトスク, Cat. 09154-85)により固定した後に、室温で1時間 PBS+0.5% Triton X-100により透過処理を行った。細胞をPBS+1%BSA+0.05% Tween-20(PBS-BT)にて2時間ブロッキングした。一次抗体はPBS-BTで希釈した後に加え、室温で2時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体をPBS-BTで1:2000希釈し、室温で2時間インキュベートした。核はDAPI(Sigma-Aldrich, Cat. D9542)を用い染色した。抗体は以下のものを用いた。

[0074]

[表1-1]

Antibodies	SOURCE	IDENTIFIER	DILUTION
Mouse monoclonal anti-CD249 (ENPEP), PE conjugated (clone BP-1)	BD Biosciences	Cat#564533; RRID: AB_2738838	1:100
Recombinant anti-TROP2 (TACSTD2), biotin conjugated (clone REA916)	Miltenyi Biotec	Cat#130-115-054; RRID: AB_2726779	1:500
Mouse monoclonal anti-HLA-ABC, APC conjugated (clone W6/32)	Biolegend	Cat#311410; RRID: AB_314879	1:100
Recombinant anti-human CD327 (SIGLEC6), biotin conjugated (clone REA852)	Miltenyi Biotec	Cat#130-112-708; RRID: AB_2725881	1:100
Rat monoclonal anti-human/mouse CD49f(ITGA6), BV421 conjugated (clone GoH3)	Biolegend	Cat#313623; RRID: AB_2562243	1:100
Mouse monoclonal anti-human CD49b(ITGA2), PE conjugated (clone HAS3)	R&D systems	Cat#FAB1233P; RRID: AB_357010	1:250
Recombinant anti-human CD365 (HAVCR1, Tim-1), biotin conjugated (clone REA384)	Miltenyi Biotec	Cat#130-106-023; RRID: AB_2654152	1:100
Recombinant anti-human CD104 (ITGB4), FITC conjugated (clone REA236)	Miltenyi Biotec	Cat#130-124-219; RRID: not available	1:100
Rat monoclonal anti-Streptavidin, APC conjugated	Biolegend	Cat#405207; RRID: not available	1:1000
Mouse monoclonal anti-CD249 (ENPEP) (clone 2D3/APA)	BD Biosciences	Cat#564532; RRID: AB_2738837	1:200
Goat polyclonal anti-human TROP2 (TACSTD2)	R&D systems	Cat#AF-650; RRID: AB_2205667	1:200
Rabbit polyclonal anti-TFAP2C	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-8977; RRID: AB_2286995	1:500
Mouse monoclonal anti-HLA-G (clone MEM-G/9)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-51678; RRID: AB_677250	1:200
Mouse monoclonal anti-human CDX2 (clone CDX2-88)	Abcam	Cat#ab157524; RRID: AB_2721036	1:50
Goat polyclonal anti-human GATA3	R&D systems	Cat#AF2605; RRID: AB_2108571	1:100

[0075]

[表1-2]

Rabbit monoclonal anti-KRT7 (clone EPR17078)	Abcam	Cat#181598; RRID: not available	1:200
Mouse monoclonal anti-KRT19 (clone RCK108)	Dako	Cat#M0888; RRID: not available	1:200
Rabbit polyclonal anti-CD327 (SIGLEC6)	Sigma	Cat#HPA009084; RRID: AB_1079967	1:200
Mouse monoclonal anti-hCG beta antibody (clone 5H4-E2)	Abcam	Cat#ab9582; RRID: AB_296507	1:200
DAPI	Sigma	Cat#D9542	1:1000
Donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 488-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A21202 RRID: AB_141607	1:2000
Donkey anti-rabbit IgG, AlexaFluor 555-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A31572 RRID: AB_162543	1:2000
Donkey anti-goat IgG, AlexaFluor 555-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A21422 RRID: AB_141822	1:2000
Donkey anti-Rat IgG, AlexaFluor 488-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A21208 RRID: AB_141709	1:2000
Donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 647-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A31571 RRID: AB_162542	1:2000
Donkey anti-rabbit IgG, AlexaFluor 647-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A31573 RRID: AB_2536183	1:2000
Donkey anti-goat IgG, AlexaFluor 647-conjugated	ThermoFisher scientific	Cat#A21447 RRID: AB_141844	1:2000

[0076] 結果

<栄養外胚葉 (TE) 特異的マーカーの選定>

既報(Petropoulos S et al. 2016 Cell, Stirparo GG et al. 2018 Development)のヒト着床前胚のシングルセルRNAシーケンシングデータを再解析した。着床前胚の発生段階は受精直後の受精卵(zygote)、4細胞期(4 cell stage)、8細胞期(8 cell stage)、桑実胚期(morula stage)、胚盤胞期(blastocyst stage)である。胚盤胞期は細胞の種類により細分化でき、将来胎児成分となる胚盤葉上層、将来卵黄嚢を形成する胚盤葉下層、将来胎盤となる栄養外胚葉と3つに分類される。

TACSTD2は胚齢5および胚齢7の栄養外胚葉で転写産物の発現量が高値である一方で、それ以外の着床前胚の発生段階（受精直後の受精卵、4細胞期、8細胞期、桑実胚期、胎齢5胚盤葉上層、胎齢7胚盤葉上層、胎齢5胚盤葉下層、胎

齢7胚盤葉下層) では転写産物の発現量は低値であった。

ENPEPは胚齢7の栄養外胚葉で転写産物の発現量が高値である一方で、それ以外の着床前胚の発生段階（受精直後の受精卵、4細胞期、8細胞期、桑実胚期、胎齢5胚盤葉上層、胎齢7胚盤葉上層、胎齢5胚盤葉下層、胎齢7胚盤葉下層、胎齢5栄養外胚葉）では転写産物の発現量は低値であった。

このような着床前胚におけるTACSTD2とENPEPの発現パターンより、我々はTACSTD2とENPEPが栄養外胚葉の表面抗原蛋白として使用できることを見出し、栄養外胚葉分化の指標として選択した。

[0077] <栄養外胚葉分化>

ナイーブ型iPS細胞を種々の分化誘導因子を含む培地で培養し、TACSTD2、ENPEPの発現を指標にして、トロホblast分化誘導因子をスクリーニングした。なお、トロホblast分化誘導因子の候補因子はトロホblastにおけるレセプター発現パターンから予測し、スクリーニングに使用した。

スクリーニングの結果、4因子（TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMP4、JAK阻害剤）を同定した。表2にこれらを組み合わせて用いた各培養条件を、図1に各条件で培養したときのTACSTD2、ENPEP両陽性細胞の割合を示す。また、図2には、そのなかの代表的なフローサイトメトリーの結果を示し、図3には得られたTACSTD2、ENPEP両陽性細胞の形態を示す。

[0078]

[表2]

Conditions Details	
C1	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C2	(PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (PD0325901 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C3	(A83-01 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (A83-01 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C4	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M) 1Day -> (A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C5	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M) 2Days
C6	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M) 3Days
C7	(Activin 50ng/ml + PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (Activin 50ng/ml + PD0325901 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C8	(TGF- β 1 2 μ M + PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (TGF- β 1 2 μ M + PD0325901 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C9	(A83-01 2 μ M + basic FGF 10ng/ml + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (A83-01 2 μ M + basic FGF 10ng/ml + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C10	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + LDN193189 300nM) 1Day -> (A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + JAK inhibitor 1 μ M) 2Days
C11	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + IL-6 10 μ M) 2Days
C12	(A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + BMP4 10ng/ml) 1Day -> (A83-01 2 μ M + PD0325901 2 μ M + LIF 10ng/ml) 2Days
C13	DMSO

[0079] その結果、C1の条件が最も効率よく分化できたが、TGF β 阻害剤（A83-01）、MEK阻害剤（PD0325901）、BMP4、JAK阻害剤のうち2種以上を用いた場合にはいずれもTACSTD2、ENPEP両陽性細胞を得ることができた。なお、A83-01の代わりにアクチビン（TGF β シグナル活性化剤）を加えたC7の条件ではTACSTD2、ENPEP両陽性細胞を得ることができなかった。

[0080] さらに、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMP4、JAK阻害剤の好ましい組み合わせを検討した。表3に培養条件を、図4に各条件で培養したときのTACSTD2、ENPEP両陽性細胞の割合を示す。

その結果、TGF β 阻害剤とMEK阻害剤は分化誘導工程の全体にわたって存在することが好ましいが、BMP4は少なくとも分化誘導工程の前半（例えば、分化誘導開始から24時間までの間）には存在することが好ましく、JAK阻害剤は少なくとも分化誘導工程の後半（例えば、分化誘導開始24時間以降）には存在することが好ましいことが分かった。

[0081]

[表3]

Conditions	Details
Qp1	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml 1Day -> (A83-01 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 2Days
Qp2	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml + JAK inhibitor 1 μM 2Days -> A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM 1Day
Qp3	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml + JAK inhibitor 1 μM 1Day -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 1Day
Qp4	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml + JAK inhibitor 1 μM 1Day -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 2Days
Qp5	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml + JAK inhibitor 1 μM 2Days -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 1Day
Qp6	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml 2Days -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 1Day
Qp7	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml 2Days -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 3Days
Qp8	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml 2Days -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 1Day -> (A83-01 2 μM + BMP4 10ng/ml + JAK inhibitor 1 μM) 1Day -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 1Day
Qp9	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml 1Day -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + JAK inhibitor 1 μM) 2Days
Qp10	0.83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml 2Days -> (A83-01 2 μM + P030325901 2 μM + BMP4 10ng/ml) 1Day
Qp11	DMSO

[0082] 以上より、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMP4、JAK阻害剤を組み合わせて使用することにより、ナイーブ型iPS細胞からTACSTD2、ENPEP両陽性細胞を得ることができた。このTACSTD2、ENPEP両陽性細胞を栄養外胚葉(TE)様細胞として、以下、評価を行った。

[0083] <TE様細胞の評価1>

分化誘導により得られたTE様細胞の性質を解析するため、TE様細胞の遺伝子発現パターンを、インビボTEにおける遺伝子発現パターンおよびインビボエピblast細胞(EPI：胚盤葉上層)における遺伝子発現パターンと比較した。

なお、解析対象遺伝子は、インビボTEおよびインビボエピblast細胞における発現変動遺伝子(DEG: differential expression gene)を用いた。具体的には、DEG01はStirparo(2018)Development#Integrated analysis of single-cell embryo data yields a unified transcriptome signature for the human pre-implantation epiblastのTableS1で示されたEpiblastとTrophectodermを区別できるp値が0.001未満の遺伝子201個で検討した。

同様の比較は、プライム型iPS細胞を同様の条件で培養して得られた細胞および非特許文献4のEPSCについても行った。いずれも2回ずつ実験を行い、Day0(分化誘導開始前)またはDay3(分化誘導開始3日後、EPSCは4日後)の遺伝子発現パターンを見た。

[0084] 結果を表4に示す(N#D3、P#D3はそれぞれナイーブ型iPSCまたはプライム型iPSCのDay3を示す)。ここでは、値が1に近ければ、相関が高いことを示している。

DEG(EPIvsTE)を用いて、インビボの栄養外胚葉(trophectoderm; TE)とインビトロの分化誘導細胞の相関を検討したところ、Naive由来の分化3日目(trophectoderm-like cell)がEPSC Day4やPrimed Day3(非特許文献3の”trophoblast-like cell”)よりも、高い相関係数を示した。(N#D3がP#D3とEPSC#Day4と比べて、TEに近かった。)

このように、分化TE様細胞はインビボTEと似た遺伝子発現パターンを示し

た。一方、先行技術文献に記載のプライム型多能性幹細胞やEPSCではインビボTEと似たパターンは示さなかった。

[0085] [表4]

	EPI	TE
01_Naive_Ex1	0.693	0.276
01_Naive_Ex2	0.692	0.277
17_Primed_Ex1	0.426	0.185
17_Primed_Ex2	0.433	0.197
H1-EPSC_day_0_rep1	0.484	0.217
H1-EPSC_day_0_rep2	0.482	0.220
04_N_D3_Ex1	0.415	0.824
04_N_D3_Ex2	0.419	0.822
20_P_D3_Ex1	0.344	0.673
20_P_D3_Ex2	0.342	0.683
H1-EPSC_day_4_rep1	0.364	0.565
H1-EPSC_day_4_rep2	0.366	0.564

[0086] 次に、TE様細胞について、TE特異的マーカーの発現をマーカー特異的抗体を用いた免疫組織染色で調べた。結果を図5に示す。その結果、TEができていることをタンパクマーカー発現でも確認できた。

[0087] <CT様細胞の評価>

妊娠初期栄養膜細胞のクライテリアとして、1) HLA-AおよびHLA-Bは発現しない、2) GATA3、TFAP2C、KRT7が発現する、3) 第19番染色体マイクロRNAが発現する、および4) ELF5プロモーターが脱メチル化されている、がある。

本発明の方法で得られたCT様細胞は上記4つのクライテリアを満たすかを調べた。

[0088] まず、HLA-A、HLA-Bの発現量を評価した。その結果、図6に示すように、本発明の方法で得られたCT様細胞は、胎盤におけるインビボCTと同様、HLA-AおよびHLA-Bをほとんど発現しないことが分かった。一方、プライム型ES細胞

はBMP処理してもHLA-A、HLA-B陽性であった。

[0089] 次に、栄養膜細胞のマーカーであるGATA3、TFAP2C、KRT7の発現量を評価した。その結果、図7に示すように、本発明の方法で得られたCT様細胞は、これらのマーカーを発現していることが分かった。

[0090] 次に、第19番染色体マイクロRNA (miR518c-5p、miR520c-3p) の発現量を評価した。その結果、図8に示すように、本発明の方法で得られたTE様細胞およびCT様細胞は、第19番染色体マイクロRNAの発現量が多いことが分かった。

[0091] 次に、ELF5プロモーターのメチル化状態を評価した。結果を図9に示す。trophectoderm-like cells(栄養外胚葉様細胞)、cytotrophoblast-like cells(細胞性栄養膜細胞様細胞)、ナイーブ型ES細胞、プライム型ES細胞およびBMP-treated cells(プライム型ES細胞にBMP4を添加し3日間培養した細胞)のメチル化率はそれぞれ10.0%、0.5%、29.3%、85.2%、22.7%であり、trophectoderm-like cellsおよびcytotrophoblast-like cellsは強い脱メチル化を認めた。このように、本発明の方法で得られたTE様細胞およびCT様細胞は、ELF5プロモーターの脱メチル化率が高いことが分かった。

以上のように、ナイーブ型ES細胞から分化誘導して得られたCT様細胞は、インビボのCTの性質を忠実に再現していることが分かった。

[0092] <TEから細胞性栄養膜(CT)への分化>

ヒト着床前胚single-cell RNAseqでSIGLEC6は全く発現していない。一方、妊娠初期絨毛のRNA sequence dataからCTではTACSTD2、ENPEP、SIGLEC6が発現していることが予想された。そこで妊娠9週、11週の臨床サンプルを用いてFACSで蛋白発現を確認したところ、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6はいずれも発現していることが確認できた。すなわち、TEではSIGLEC6が発現しないが、CTではSIGLEC6が発現する。この知見に基づき、SIGLEC6の発現の有無に基づき、CTへの分化を調べた。

また、CTではKi67が発現していることが知られている(Chang and Parast, 2017; Muhlhäuser et al., 1993)。実際に、妊娠5週のヒト絨毛膜絨毛を用いて免疫染色を行ったところ、図10に示すように、CTはKi67を発現している

ことが確認できた。一方、妊娠11週の絨毛膜絨毛では、Ki67を発現している細胞が消滅した。これは、Ki67がCTの初期段階に発現するマーカーであることを示している。

[0093] 本発明の方法で得られたTE様細胞をTGF β 阻害剤、上皮成長因子(EGF)およびWntシグナル活性化剤を含む培地で培養して得られた細胞におけるマーカーの発現を調べた結果を図11及び12に示す。その結果、TE様細胞はSIGLEC6陰性であったが、得られた細胞はSIGLEC6の発現が確認できた。さらに、得られた細胞はKi67を発現した。これらのことから、TEからCTへの分化誘導が可能であり、分化誘導されたCTは増殖能が高く、CTの初期段階にあることが分かった。

[0094] <CTから合胞体栄養膜細胞(ST)への分化>

本発明の方法で得られたCTをForskolin等を含む培地でさらに培養して得られた細胞におけるマーカーの発現を調べた結果を図13に示す。その結果、得られた細胞は細胞が癒合して核が複数見え、かつ、CGAおよびCGBの発現が確認できた。このことから、CTからSTへの分化誘導が可能であることが分かった。

[0095] <CTから絨毛外栄養膜細胞(EVT)への分化>

本発明の方法で得られたCTをTGF β 阻害剤およびNeuregulin1等を含む培地でさらに培養して得られた細胞におけるマーカーの発現を調べた結果を図14に示す。その結果、得られた細胞はHLA-GとLVRN(Laeverin)の発現が確認できた。このことから、CTからEVTへの分化誘導が可能であることが分かった。

[0096] <TE様細胞と細胞性栄養膜(CT)幹細胞におけるマーカー発現>

上記で得られたTE様細胞と細胞性栄養膜(CT)幹細胞におけるマーカー発現を各マーカーの抗体を用いたフローサイトメトリーで調べた結果、図15、16に示すように、TE様細胞では、TACSTD2、ENPEPのほかに、ITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)とHAVCR1(Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1)が陽性であることが分かった。一方、CT幹細胞では、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6のほかに、ITGA2(Integrin Subunit Alpha 2)とITGB4(Integrin Subunit B

eta 4)とITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)とHAVCR1(Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1)が陽性であることが分かった。

さらに、免疫染色で調べた結果、CT幹細胞では、図17に示すように、PTGESとHSD3Bが発現していることが分かった。

また、HAVCR1、S100P、ITGA6、ITGA2及びSIGLEC6の遺伝子発現を定量RT-PCRによって調べた結果、HAVCR1、S100P、ITGA6はCT及びTEで発現し、ITGA2及びSIGLEC6はCTで発現することが分かった（図18）。

また、妊娠5週のヒト絨毛膜絨毛では、図19に示す免疫染色の結果から、GATA3及びKRT7の他に、HAVCR1、ITGA6、ITGA2、S100P、HSD3B及びPTGESが発現していることが分かった。

以上より、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B及びSIGLEC6はCTマーカーと、ITGA6、HAVCR1、及びS100PはCT又はTEマーカーとなり得る。

[0097] <プライム型多能性幹細胞由来の細胞>

プライム型iPSCを用いた、CTへの分化誘導法とされる既知の手法(Proc Natl Acad Sci U S A 110, E1212-1221. 2013; Proc Natl Acad Sci U S A 112, E2337-2346. 2015)で作製した細胞を、pBAPとした。pBAPをフローサイトメトリー及び免疫染色で調べたところ、図17及び図20で示すように、ITGA2、ITGB4、SIGLEC6、ITGA6、HAVCR1、PTGES及びHSD3Bといった、CTマーカー及び／又はTEマーカーが発現していないことが分かった。

さらに、本発明の方法で得られたTE及びCTと、pBAPについて、カニクイザル羊膜における発現変動遺伝子の発現量を、RNAシーケンシングの結果から解析し、スキャッタープロットを図21に示す。

その結果、GATA2、GATA3、TFAP2C、TACSTD2、ENPEP、及びDAB2といった、栄養膜細胞で発現する遺伝子は、TE、CT及びpBAPにおいて共通して発現が見られた。一方、pBAPは、200個以上の羊膜に特徴的な遺伝子において、TE及びCTと比較して、有意に高い発現量が見られた。

以上より、pBAPは、CTへの分化誘導法とされる既知の手法で作製されたものの、CTではなく、むしろ羊膜様細胞であることが分かった。

[0098] <羊膜細胞マーカー遺伝子>

さらに、ヒトの羊膜で顕著に発現する遺伝子について、本発明の方法で得られたTE及びCTにおける発現量と、pBAPにおける発現量をヒートマップで比較した結果を、図22に示す。その結果、TE及びCTではほとんど発現せず、pBAPで顕著に発現する遺伝子として、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、P0STN、VTCN1、VIM及びHEY1が特定された。これらの遺伝子が、pBAPにおいて、TE及びCTよりも強く発現していることは、定量RT-PCRによっても確認できた(図23)。

また、細胞表面抗原であるVTCN1は、フローサイトメトリーで調べたところ、図24に示すように、pBAPで発現が見られる一方で、CTでは発現が見られないことが確認された。以上より、上記9つの遺伝子は、羊膜細胞を選択及び／又は検出するマーカーとなり得る。

[0099] <栄養外胚葉(TE)、細胞性栄養膜(CT)、合胞体栄養膜細胞(ST)、絨毛外栄養膜細胞(EVT)の遺伝子発現パターン>

Xiangらの報告(Nature 577, 537-542. 2020)には、ヒト胚における、着床前のTE(PreTE)、着床後のCT(PostCT)、EVT初期段階(EarlyEVT)、EVT、ST初期段階(EarlyST)、またはSTの各ステージに特異的な遺伝子が報告されている。

そこで、本発明の方法で得られたTE、CT、ST及びEVTについて、上記のそれに特異的な遺伝子の発現量を図25に示す。

その結果、本発明の方法で得られたTE、CT、ST、EVTは、それぞれに対応する細胞に特異的な遺伝子の発現量が高い遺伝子発現パターンを示した。

[0100] <細胞性栄養膜(CT)の維持>

本発明の方法で得られたCTは、2～3日毎に、TrypLEで剥離し、1／2～1／4の密度で再播種して継代した。CTは、図26に示すように、35回以上の継代及び70日以上の維持培養が可能であった。

さらに、30回以上(90日以上)の継代を経て維持培養したCTを、本発明の方法によりST及びEVTへ分化させたところ、図27に示す定量RT-PCRの結

果から、それぞれのマーカーが発現していることが確認できた。すなわち、本発明の方法で得られたCTは、30回以上の継代及び90日以上の維持培養を経ても、ST及びEVTへの分化能を維持していた。

[0101] <オルガノイドの形成>

本発明の方法で得られたCTを用いて、Turcoらの手法 (Nature 564, 263–267. 2018) に従い、オルガノイドを形成させた。この手法で得られたCT由来のオルガノイドは、図28に示すように、胎盤から得られる栄養膜細胞由来のオルガノイドと非常によく似た形態をしていた。このCT由来のオルガノイドは、10回以上の継代及び2か月以上の維持培養が可能であった。

定量RT-PCRによる解析によって、上記CT由来のオルガノイドは、図29に示すように、CTのマーカーとSTのマーカー双方の発現が見られた。これは、Haiderらの報告 (Stem Cell Reports 11, 537–551. 2018) およびTurcoら報告 (Nature 564, 263–267. 2018) の報告と一致する。

また、上記CT由来のオルガノイドを免疫染色した結果を、図30に示す。その結果、KRT7、GATA3及びTFAP2Aを含む、栄養膜細胞のマーカーを発現していることが分かった。さらに、Haiderらの報告 (Stem Cell Reports 11, 537–551. 2018) およびTurcoら報告 (Nature 564, 263–267. 2018) では、栄養膜細胞オルガノイドの外層がCT様細胞で構成されていると報告されており、上記CT由来のオルガノイドは、図30に示す通り、表層においてCTマーカーであるITGA6を発現していた。

以上より、上記CT由来のオルガノイドは、胎盤から得られる栄養膜細胞由来のオルガノイドに似た、3次元オルガノイドであったと考えられる。そのため、本発明の方法で得られたCTは、3次元オルガノイドを形成可能であった。

請求の範囲

- [請求項1] 栄養外胚葉細胞をインビトロで製造する方法であって、ナイーブ型多能性幹細胞を、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上の因子を含む培地で培養して栄養外胚葉細胞へ分化誘導する工程を含む方法。
- [請求項2] 前記培地はTGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される3種以上の因子を含む、請求項1に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。
- [請求項3] TGF β 阻害剤がA83-01であり、MEK阻害剤がPD0325901、BMPがBMP4、BMP2またはBMP6であり、JAK阻害剤がJAK inhibitor Iである、請求項1または2に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。
- [請求項4] さらに、栄養外胚葉細胞をTACSTD2 (Tumor Associated Calcium Sign al Transducer 2)、ENPEP (Glutamyl Aminopeptidase)、ITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)および／またはHAVCR1(Hepatitis A Virus C ellular Receptor 1)の発現を指標として純化する工程を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。
- [請求項5] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1～4のいずれか一項に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。
- [請求項6] 多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、請求項1～5のいずれか一項に記載の栄養外胚葉細胞の製造方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の方法で栄養外胚葉細胞を製造する工程、および、得られた栄養外胚葉細胞をTGF β 阻害剤、上皮成長因子(EGF)およびWntシグナル活性化剤を含む培地で培養して細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程を含む、細胞性栄養膜細胞の製造方法。
- [請求項8] さらに、細胞性栄養膜細胞をTACSTD2、ENPEP、SIGLEC6 (Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 6)、Ki67 (MKI67(Marker Of Proliferation Ki-67))、ITGA2(Integrin Subunit Alpha 2)、ITGB4(Integrin Subunit Beta 4)、PTGES (Prostaglandin E Synthase)、HSD3B (3 be

ta-hydroxysteroid dehydrogenase)、S100P、ITGA6(Integrin Subunit Alpha 6)および／またはHAVCR1の発現を指標として純化する工程を含む、請求項 7 に記載の細胞性栄養膜細胞の製造方法。

- [請求項9] 請求項 7 または 8 に記載の方法で細胞性栄養膜細胞を調製する工程、および、得られた細胞性栄養膜細胞を培養して合胞体栄養膜細胞および／または絨毛外栄養膜細胞に分化誘導する工程を含む、合胞体栄養膜細胞および／または絨毛外栄養膜細胞の製造方法。
- [請求項10] 栄養外胚葉を提供する工程、および、当該栄養外胚葉を細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程を含む、細胞性栄養膜細胞の製造方法。
- [請求項11] 栄養外胚葉を細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程は、栄養外胚葉を、TGF β 阻害剤、上皮成長因子(EGF)およびWntシグナル活性化剤を含む培地で培養することにより、細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程である、請求項 10 に記載の細胞性栄養膜細胞の製造方法。
- [請求項12] 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法で調製された栄養外胚葉細胞。
- [請求項13] 栄養外胚葉細胞を含む細胞集団から栄養外胚葉細胞を分離する方法であって、TACSTD2、ENPEP、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として栄養外胚葉細胞を選別する工程を含む、方法。
- [請求項14] 栄養外胚葉細胞を含む細胞集団において栄養外胚葉細胞を検出する方法であって、TACSTD2、ENPEP、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として栄養外胚葉細胞を検出する工程を含む、方法。
- [請求項15] TACSTD2に特異的に結合する分子、ENPEPに特異的に結合する分子、ITGA6に特異的に結合する分子および／またはHAVCR1に特異的に結合する分子を含む、栄養外胚葉細胞検出または選別用試薬。
- [請求項16] TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上の因子を含む、栄養外胚葉細胞分化誘導用ナイーブ型多能性幹細胞培地。
- [請求項17] TGF β 阻害剤がA83-01であり、MEK阻害剤がPD0325901、BMPがBMP4、BM

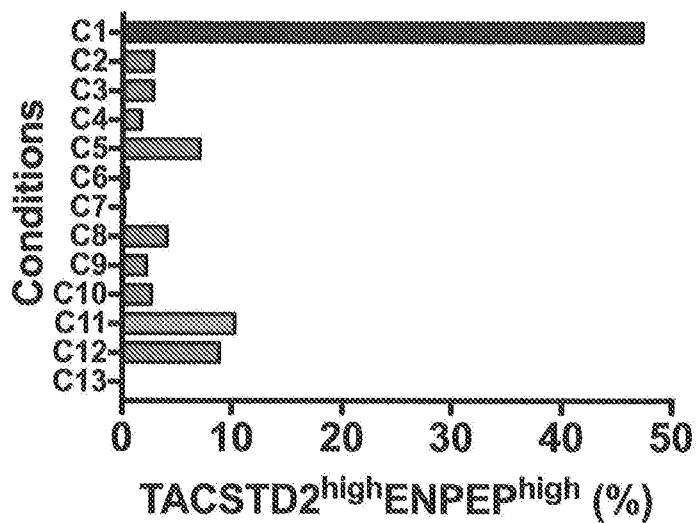
P2またはBMP6であり、JAK阻害剤がJAK inhibitor Iである、請求項16に記載のナイーブ型多能性幹細胞用培地。

- [請求項18] 細胞性栄養膜細胞を含む細胞集団から細胞性栄養膜細胞を分離する方法であって、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を選別する工程を含む、方法。
- [請求項19] 細胞性栄養膜細胞を含む細胞集団から細胞性栄養膜細胞を検出する方法であって、TACSTD2、ENPEP、SIGLEC6、ITGA2、ITGB4、PTGES、HSD3B、S100P、ITGA6および／またはHAVCR1の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を検出する工程を含む、方法。
- [請求項20] TACSTD2に特異的に結合する分子、ENPEPに特異的に結合する分子、SIGLEC6に特異的に結合する分子、ITGA2に特異的に結合する分子、ITGB4に特異的に結合する分子、PTGESに特異的に結合する分子、HSD3Bに特異的に結合する分子、S100Pに特異的に結合する分子、ITGA6に特異的に結合する分子および／またはHAVCR1に特異的に結合する分子を含む、細胞性栄養膜細胞の検出または選別用試薬。
- [請求項21] 羊膜細胞を含む細胞集団から羊膜細胞を分離する方法であって、TNC(Tenascin C)、CDH10(Cadherin 10)、PKDCC(Protein Kinase Domain Containing, Cytoplasmic)、GABRP(Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Pi)、IGFBP5(Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5)、POSTN(Periostin)、VTCN1(V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1)、VIM(Vimentin)および／またはHEY1(Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1)の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を選別する工程を含む、方法。
- [請求項22] 羊膜細胞を含む細胞集団から羊膜細胞を検出する方法であって、TNC、CDH10、PKDCC、GABRP、IGFBP5、POSTN、VTCN1、VIMおよび／またはHEY1の発現を指標として細胞性栄養膜細胞を検出する工程を含む、方

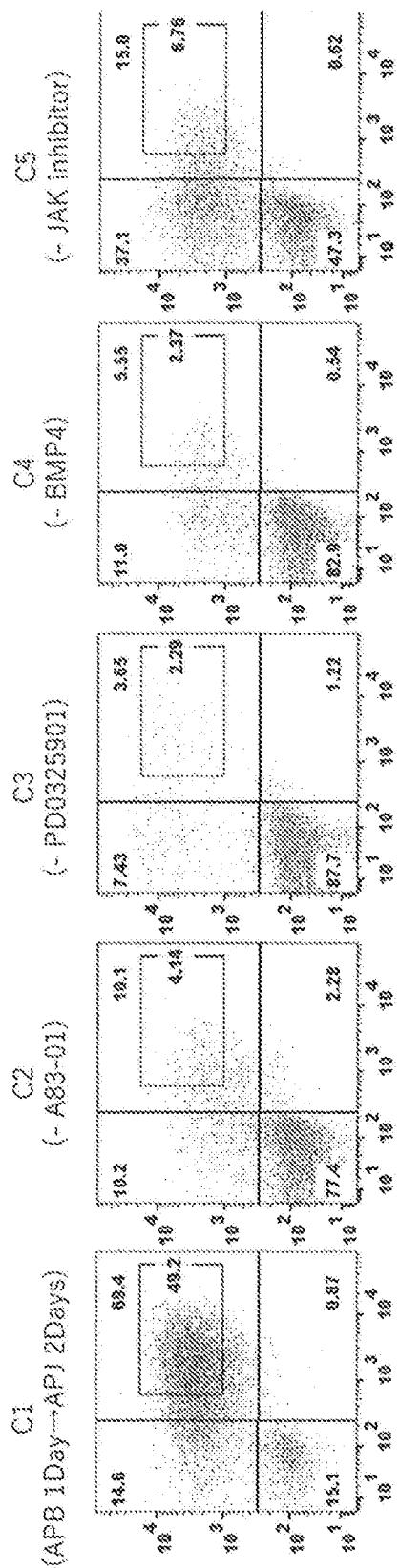
法。

[請求項23] TNCに特異的に結合する分子、CDH10に特異的に結合する分子、PKDCCに特異的に結合する分子、GABRPに特異的に結合する分子、IGFBP5に特異的に結合する分子、POSTNに特異的に結合する分子、VTCN1に特異的に結合する分子、VIMに特異的に結合する分子および／またはHEY1に特異的に結合する分子を含む、羊膜細胞の検出または選別用試薬。

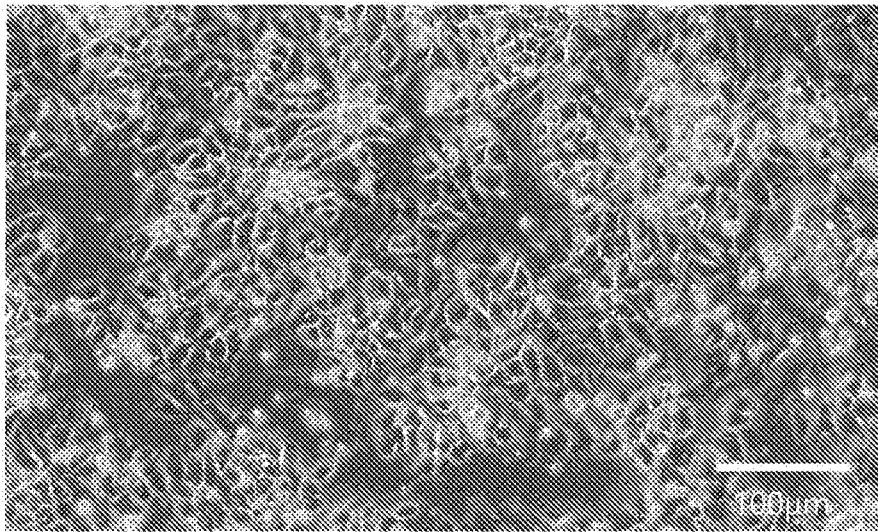
[図1]



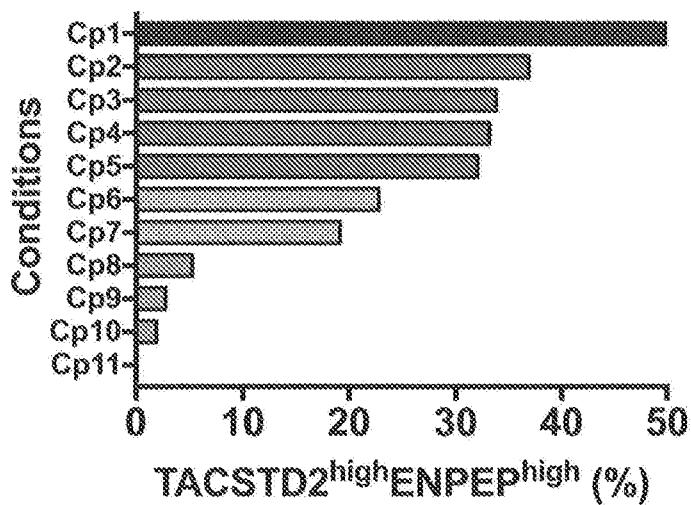
[図2]



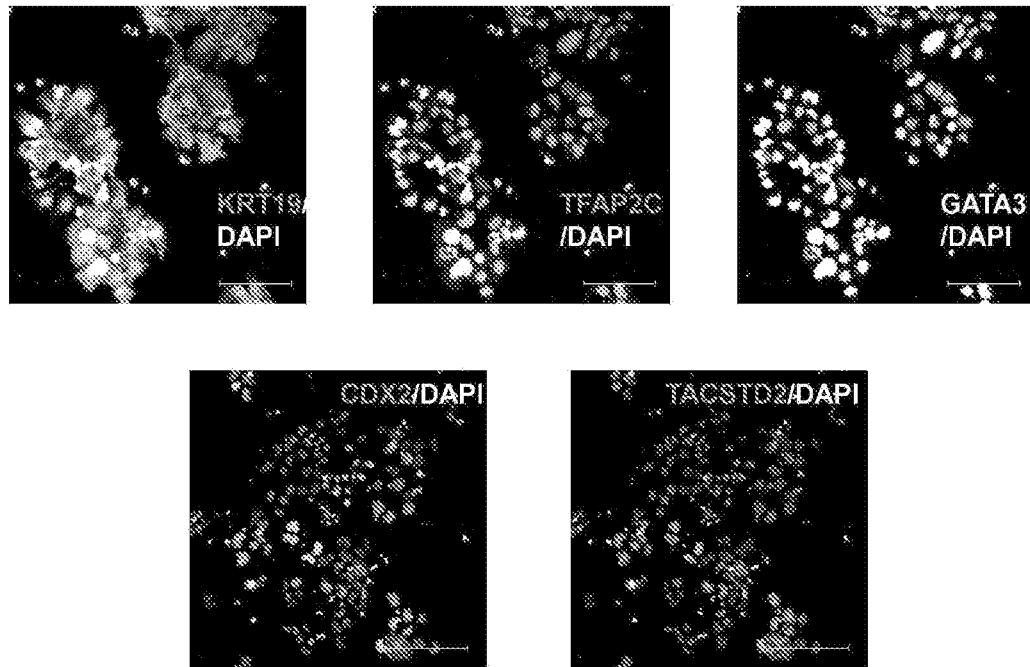
[図3]



[図4]

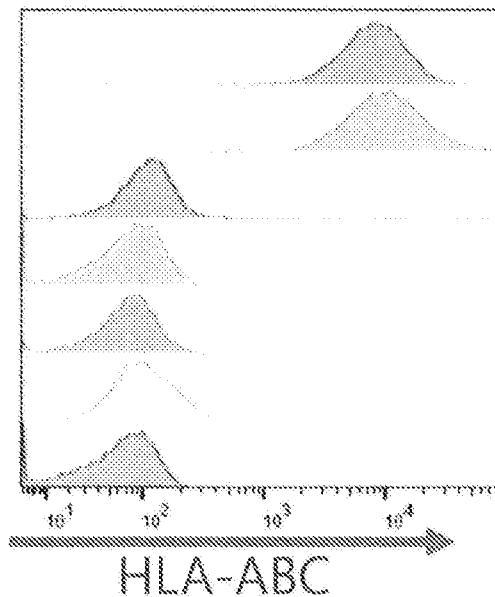


[図5]

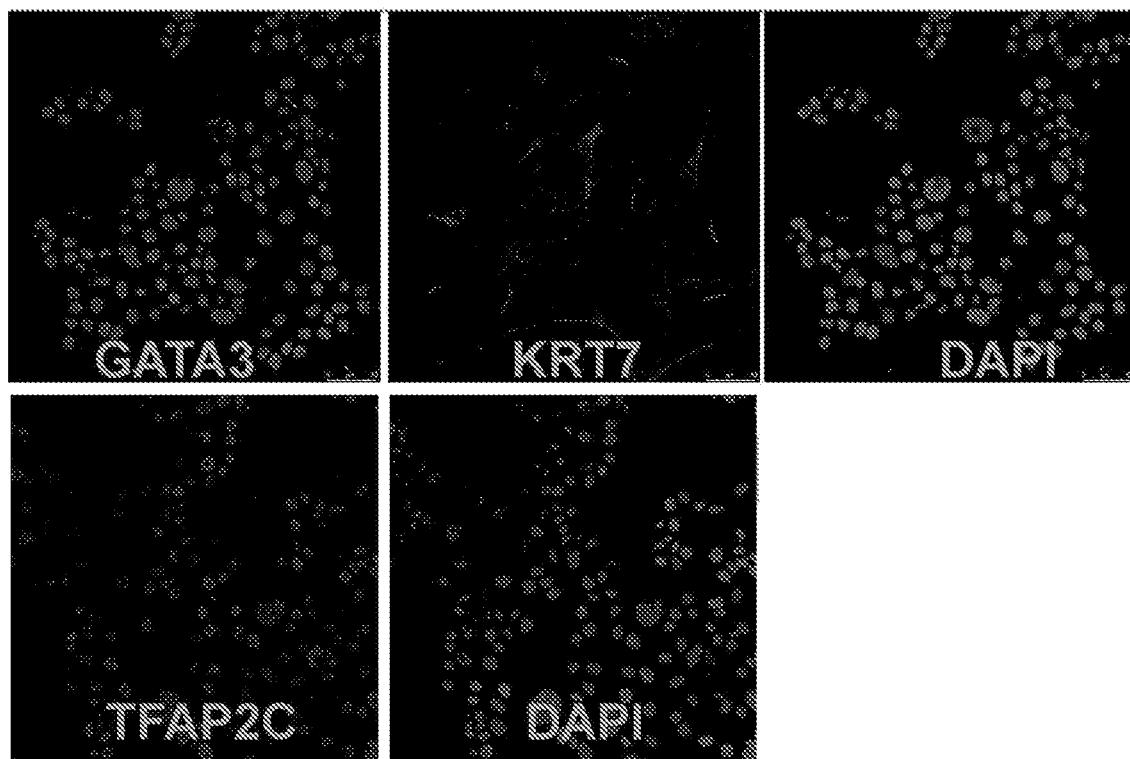


[図6]

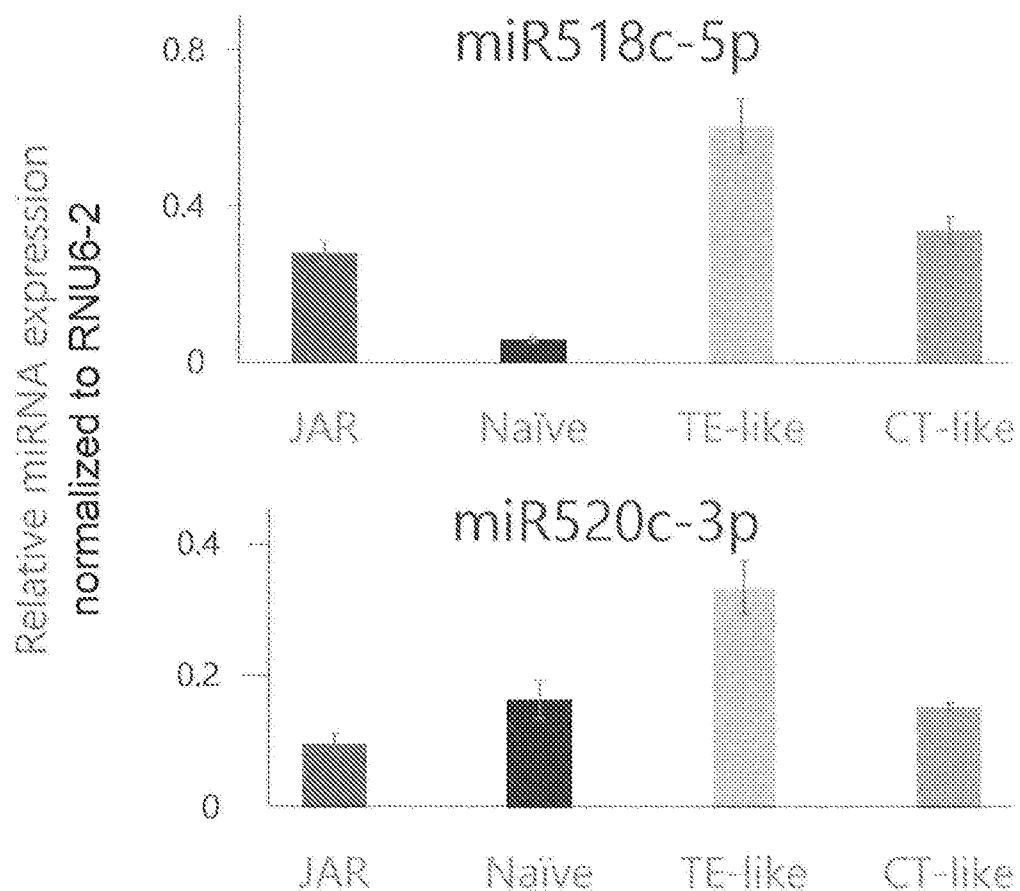
BMP-treated primed ESCs
Primed ESCs
9 week placenta
Cytotrophoblast-like cells
Trophectoderm-like cells
Naïve ESCs
Control



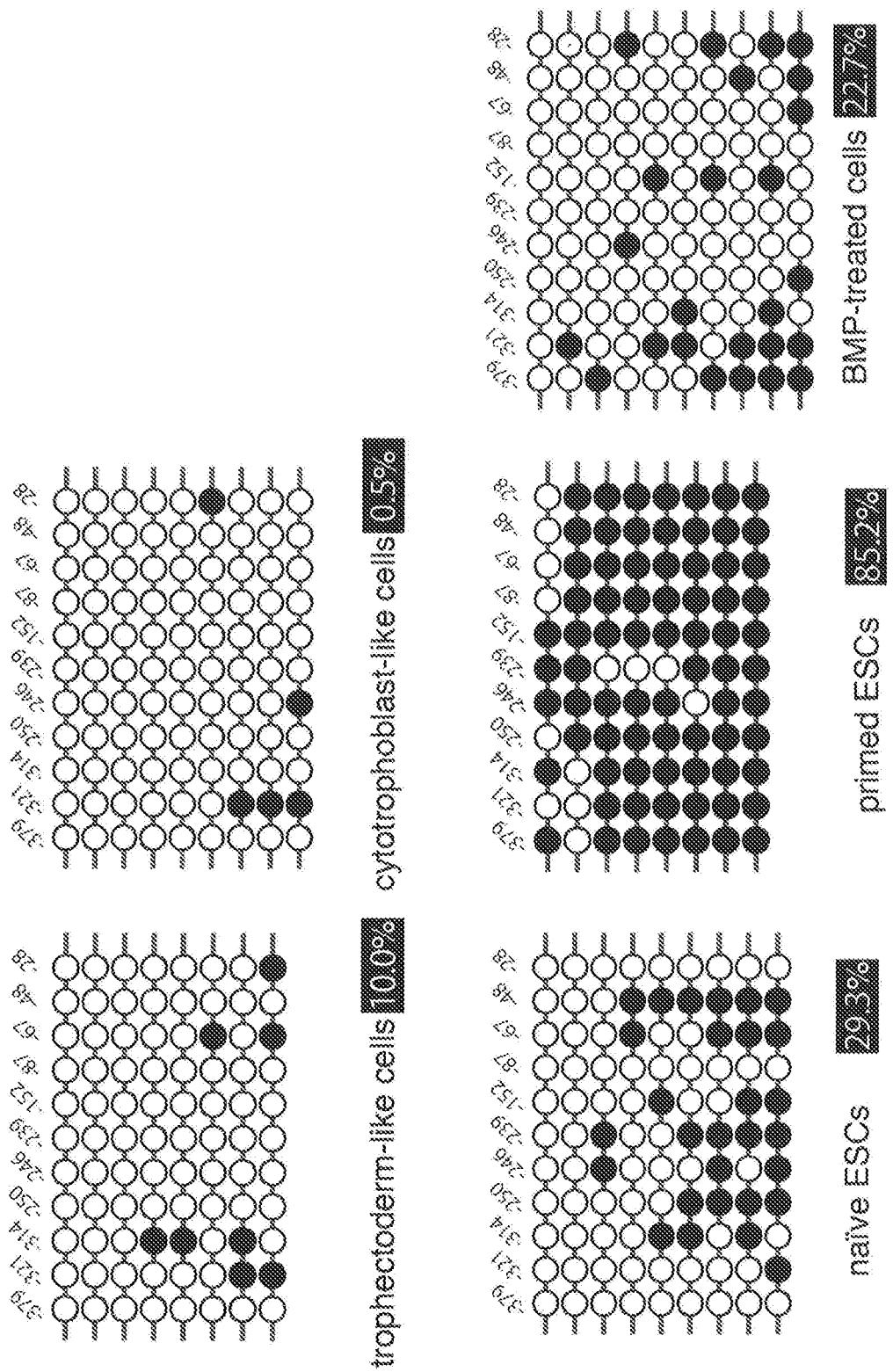
[図7]



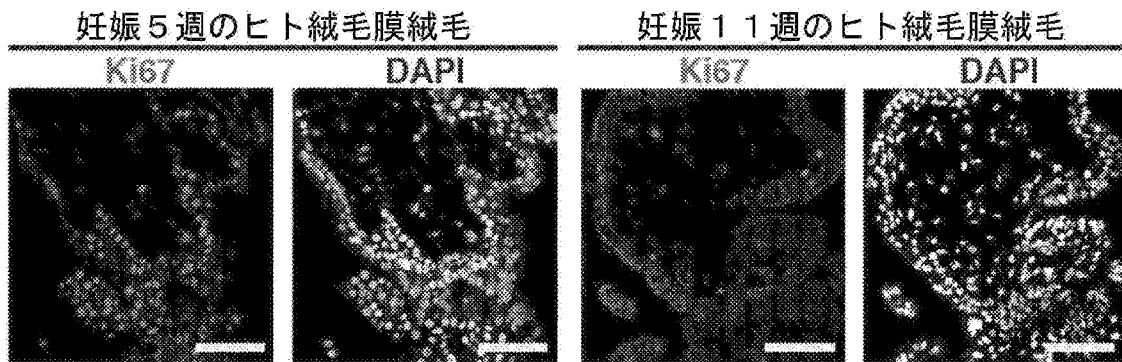
[図8]



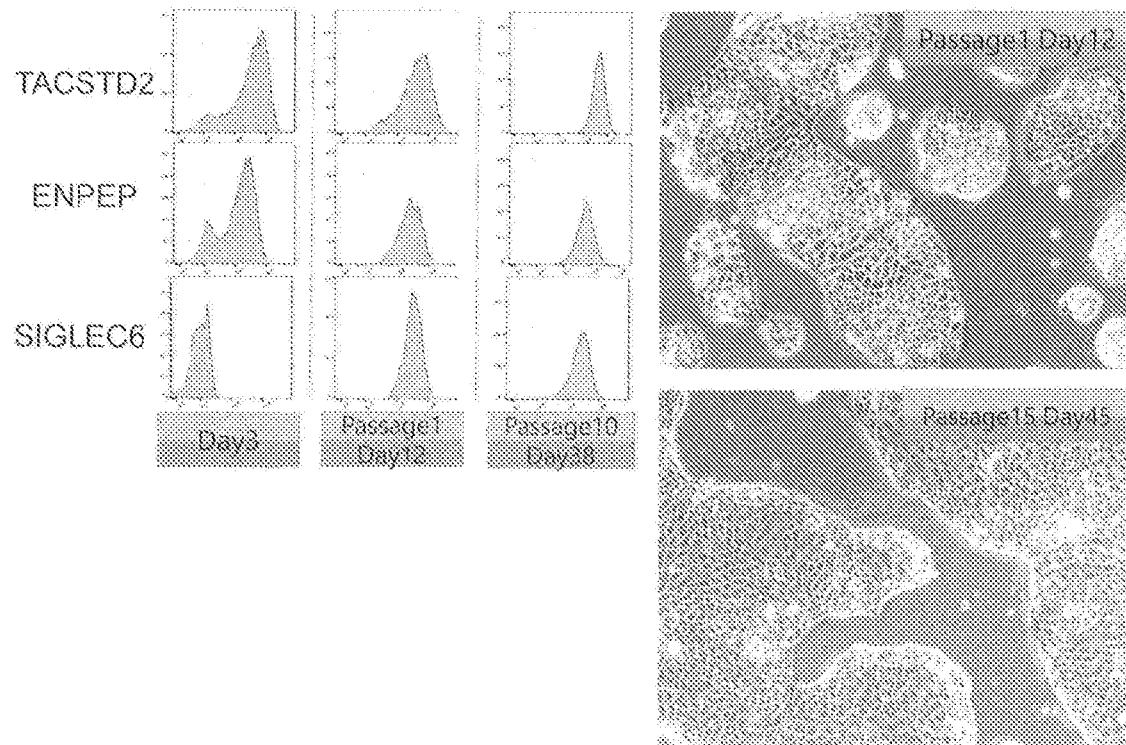
[図9]



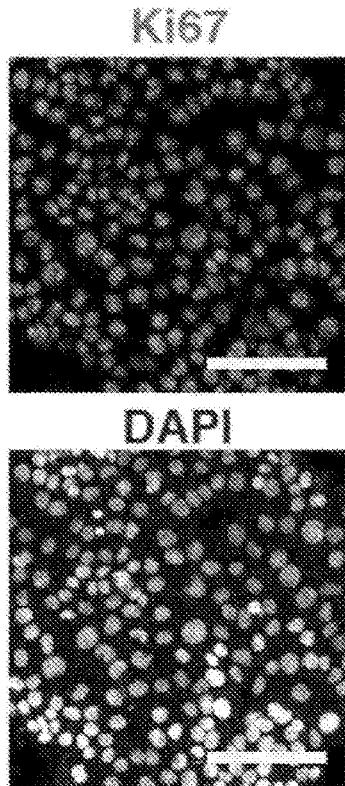
[図10]



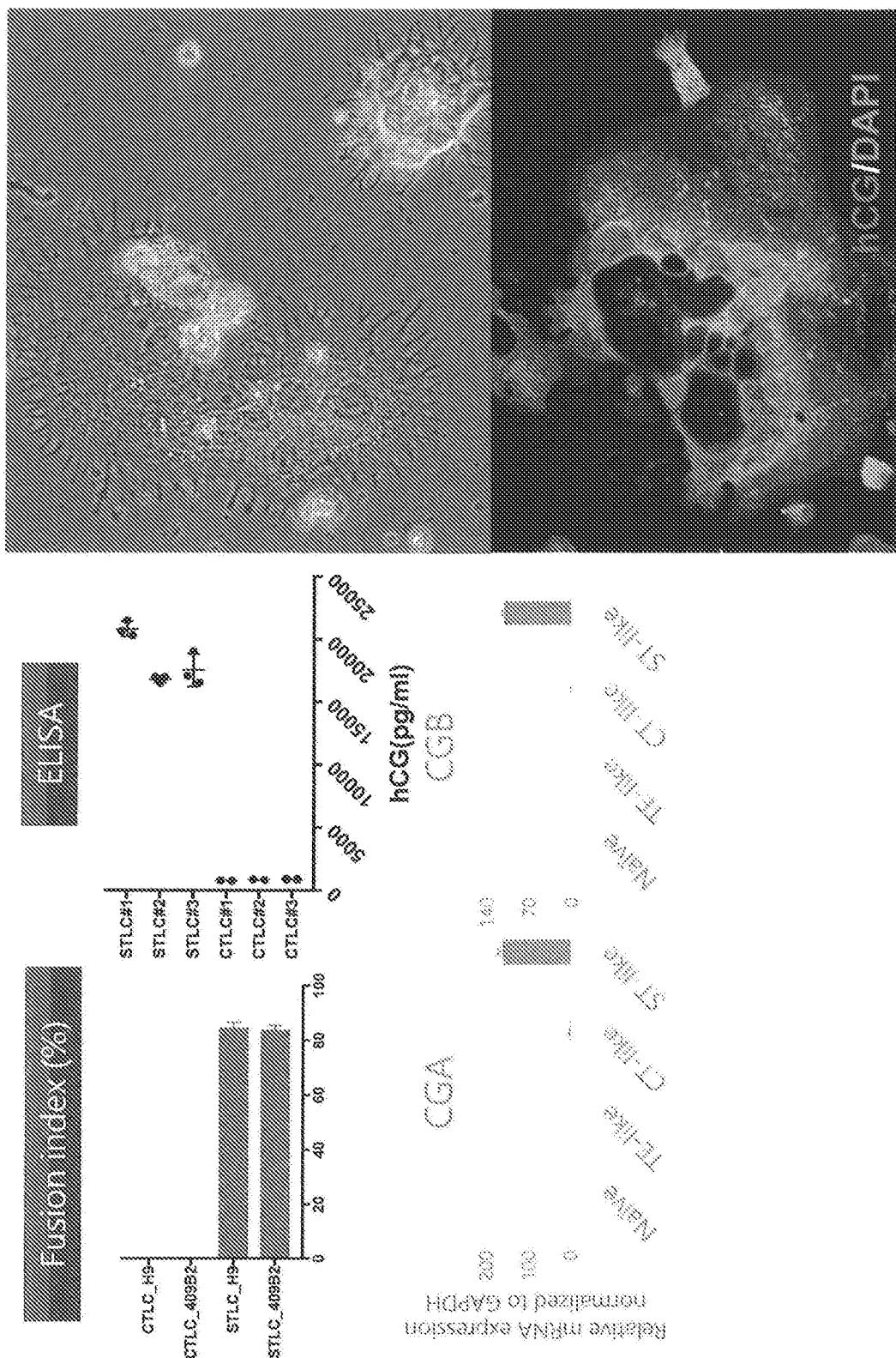
[図11]



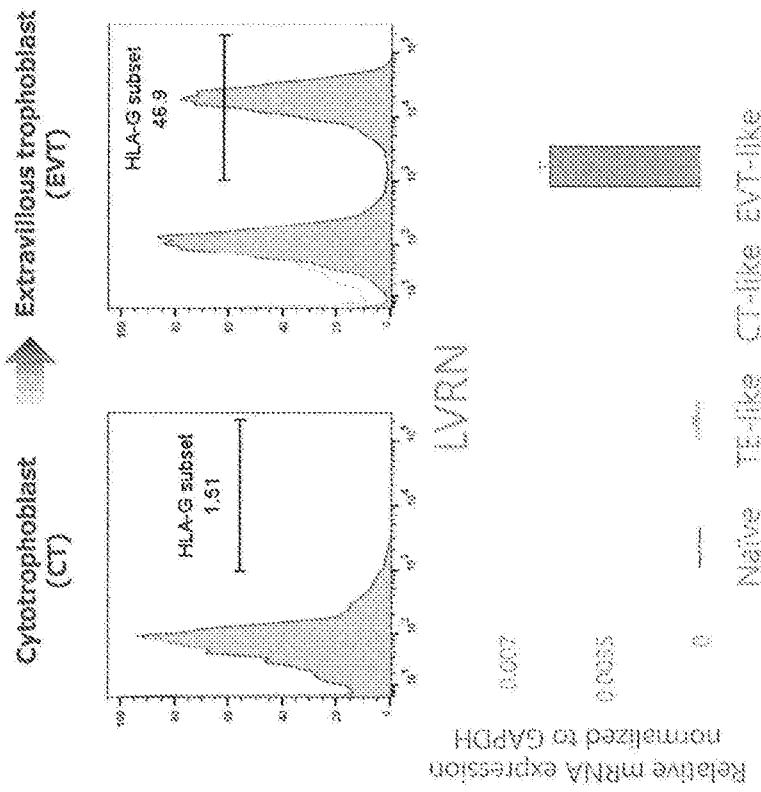
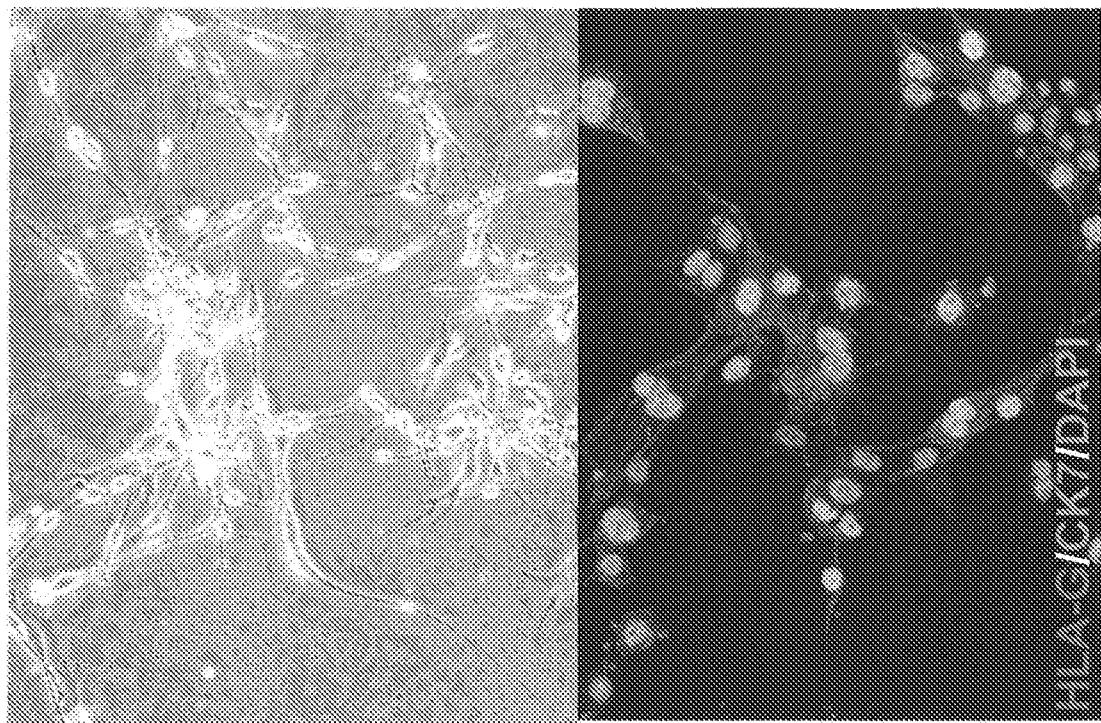
[図12]



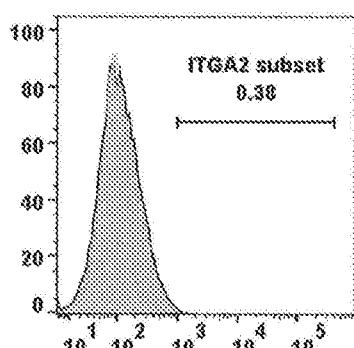
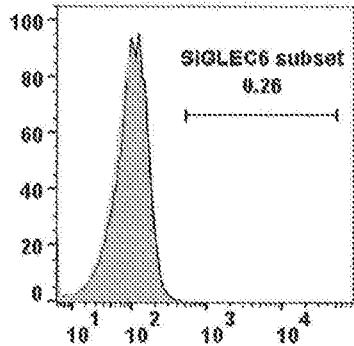
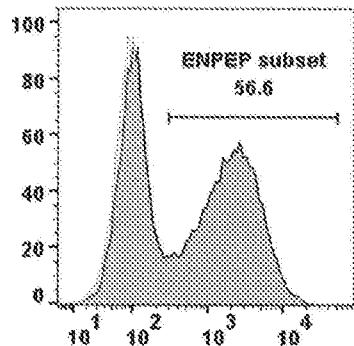
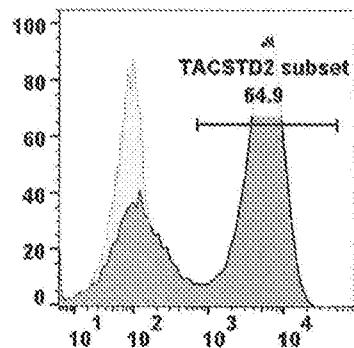
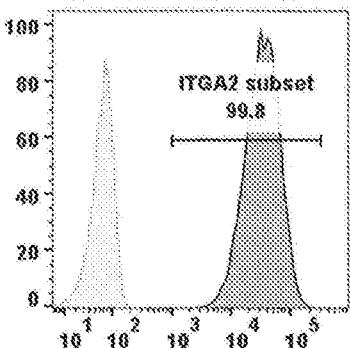
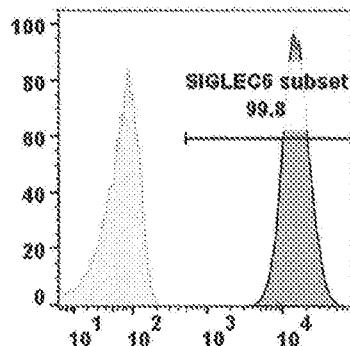
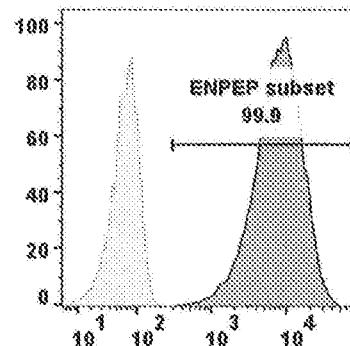
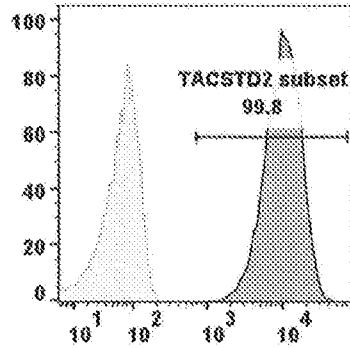
[図13]



[図14]

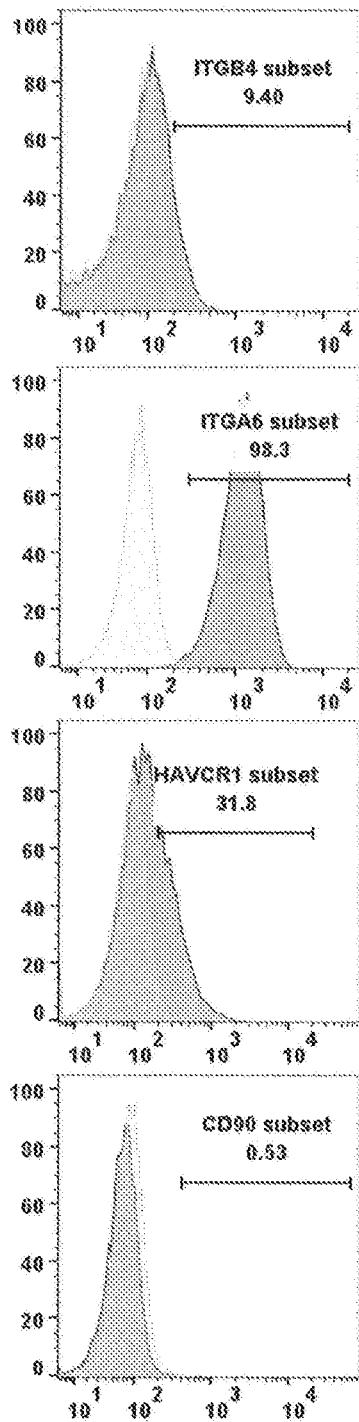


[図15]

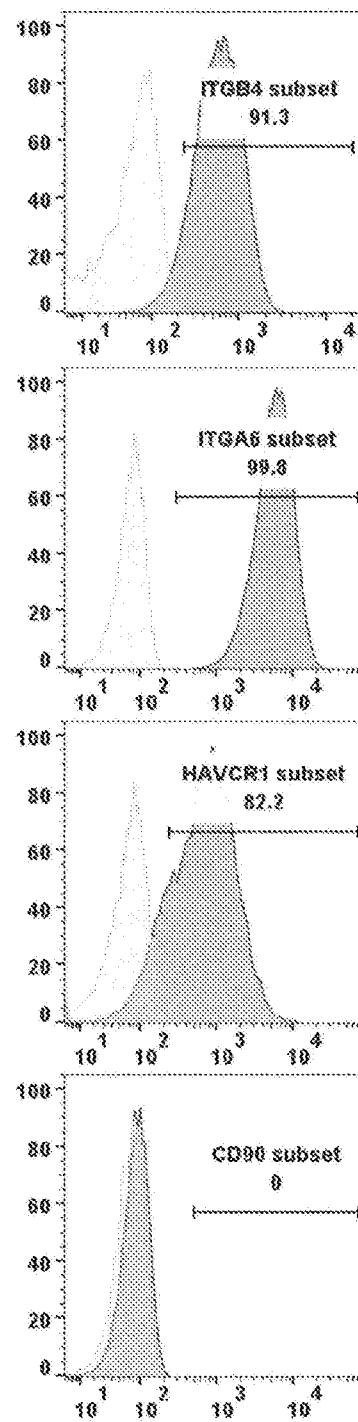
**trophectoderm
-like cell****cytotrophoblast
stem cell**

[図16]

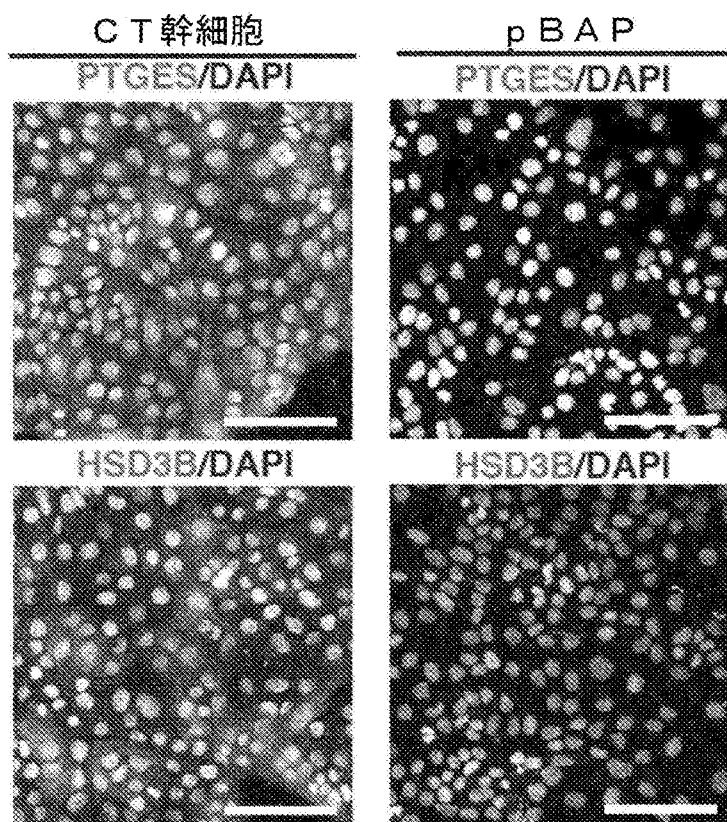
trophectoderm
-like cell



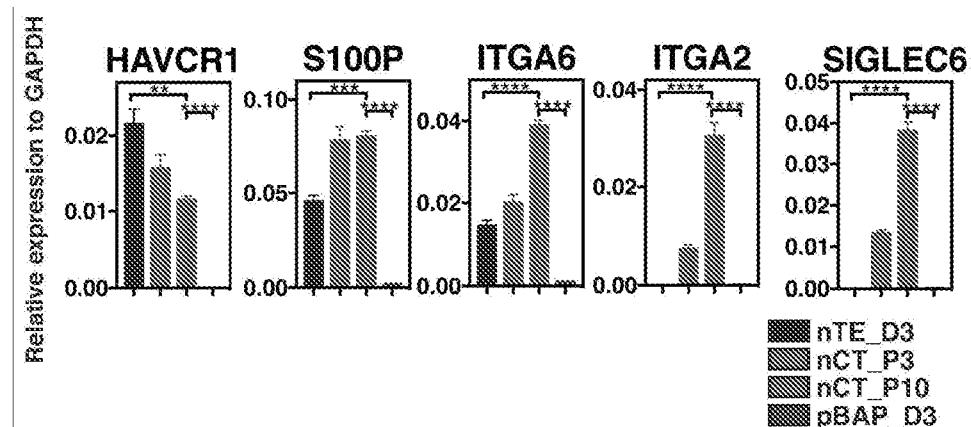
cytotrophoblast
stem cell



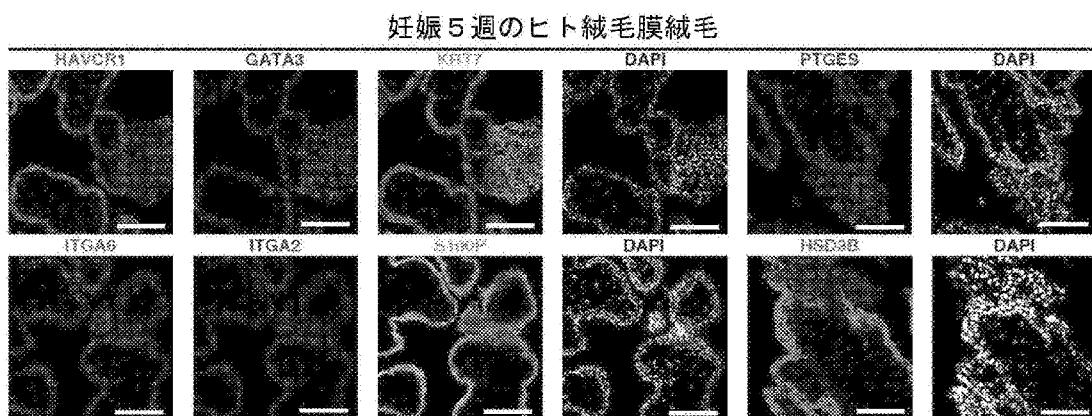
[図17]



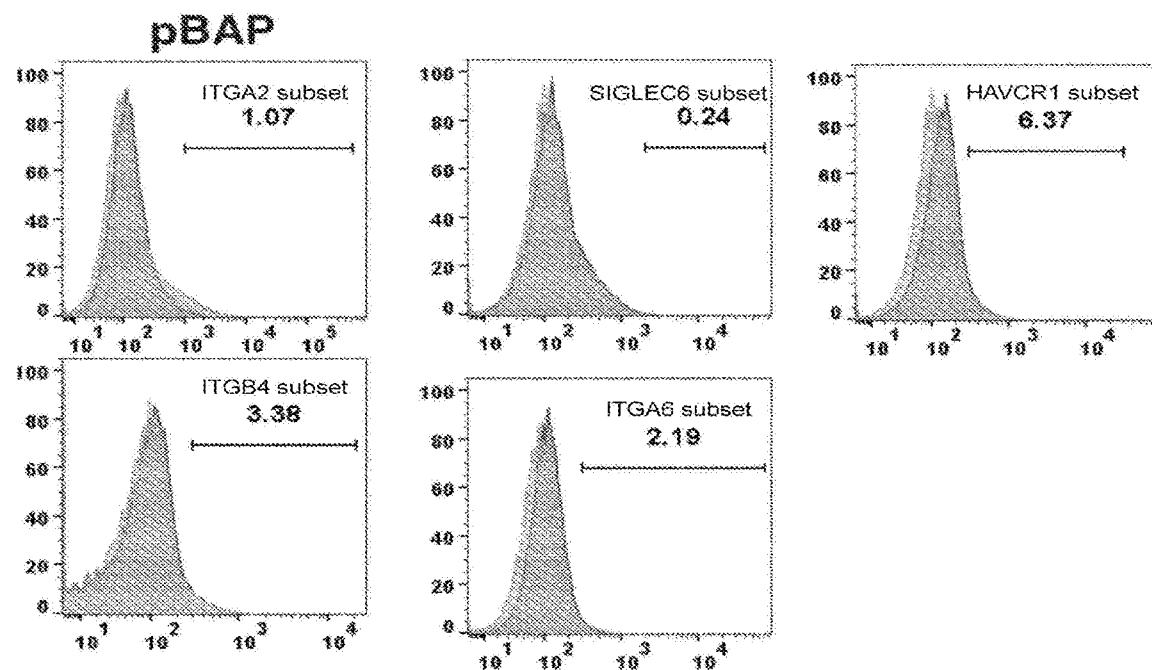
[図18]



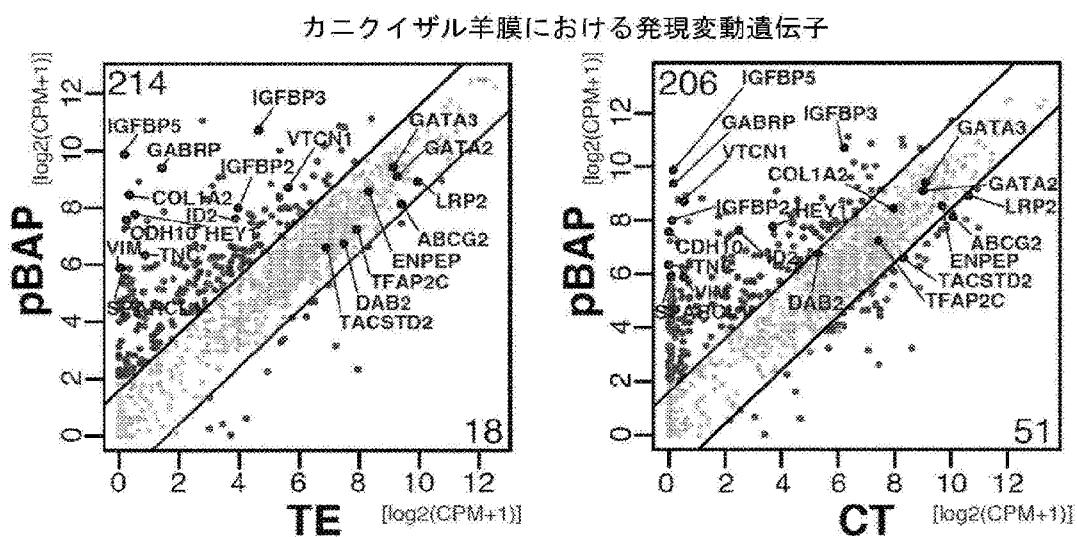
[図19]



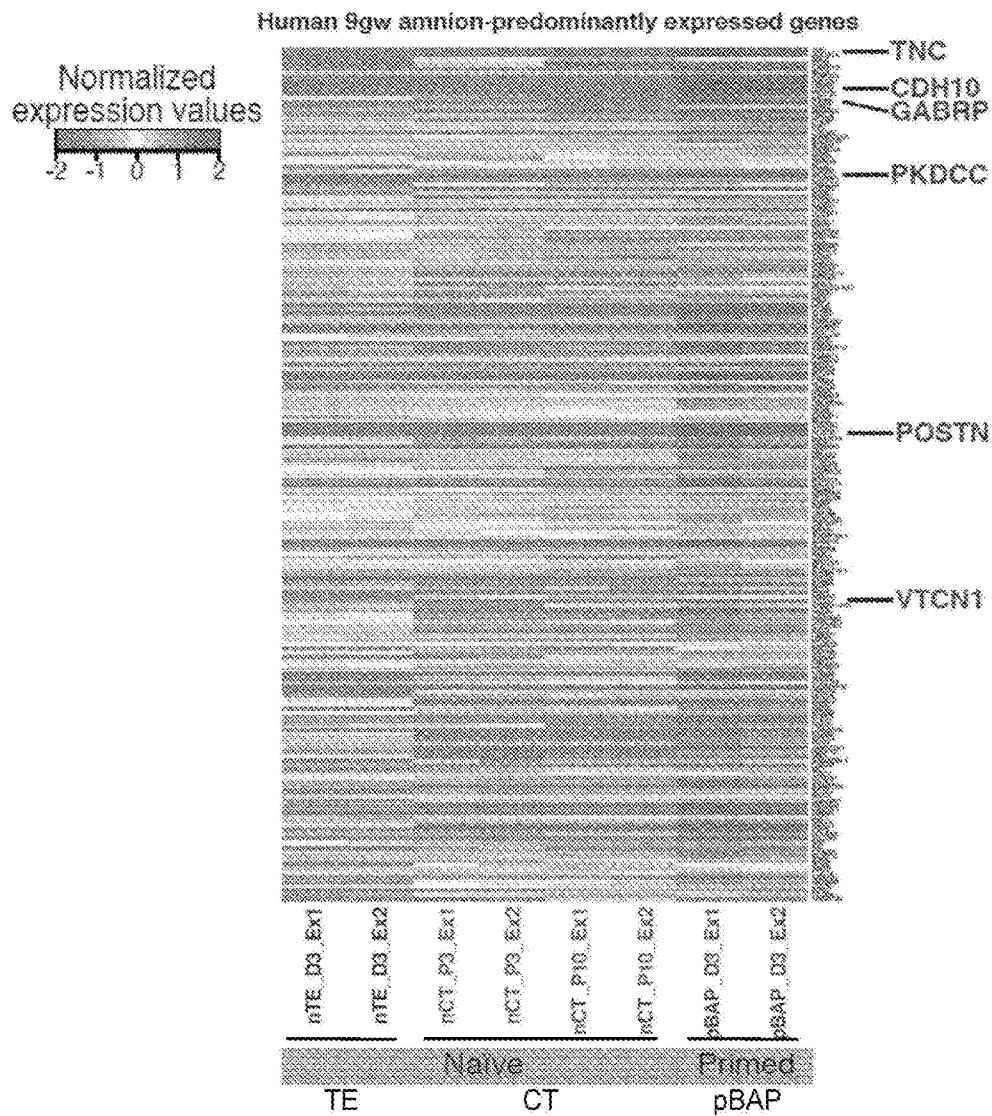
[図20]



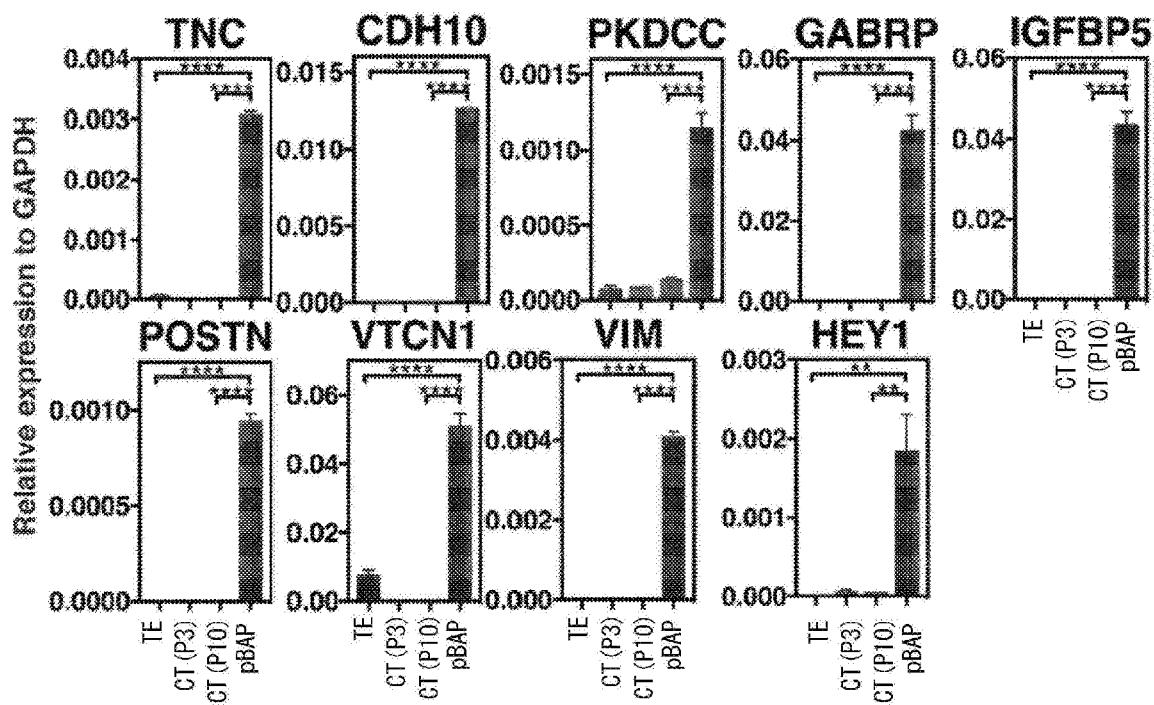
[図21]



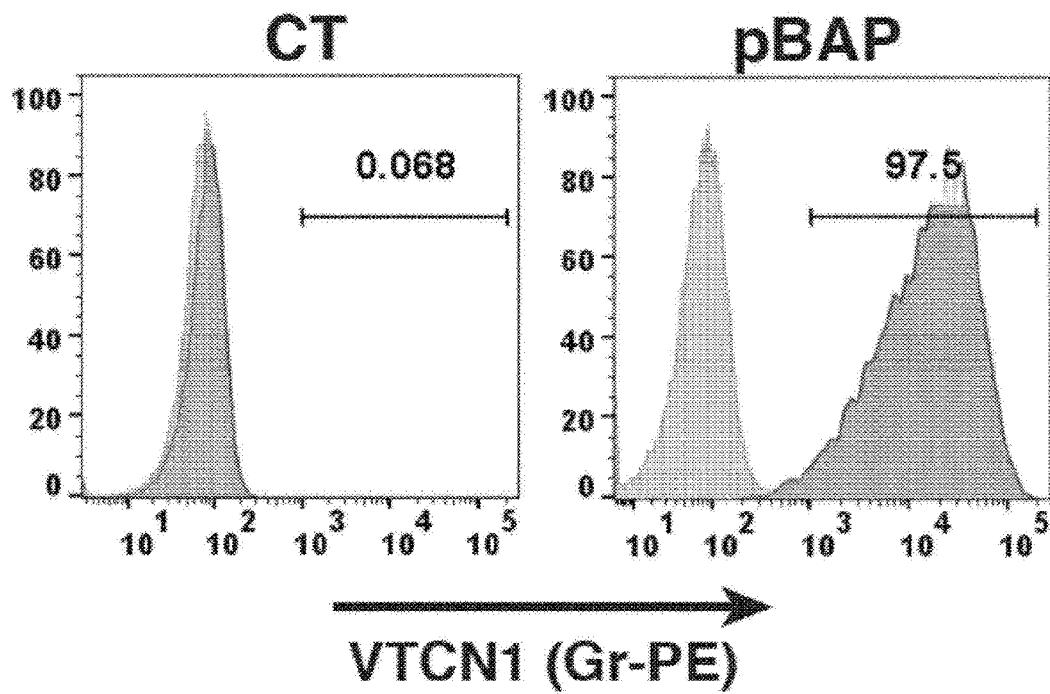
[図22]



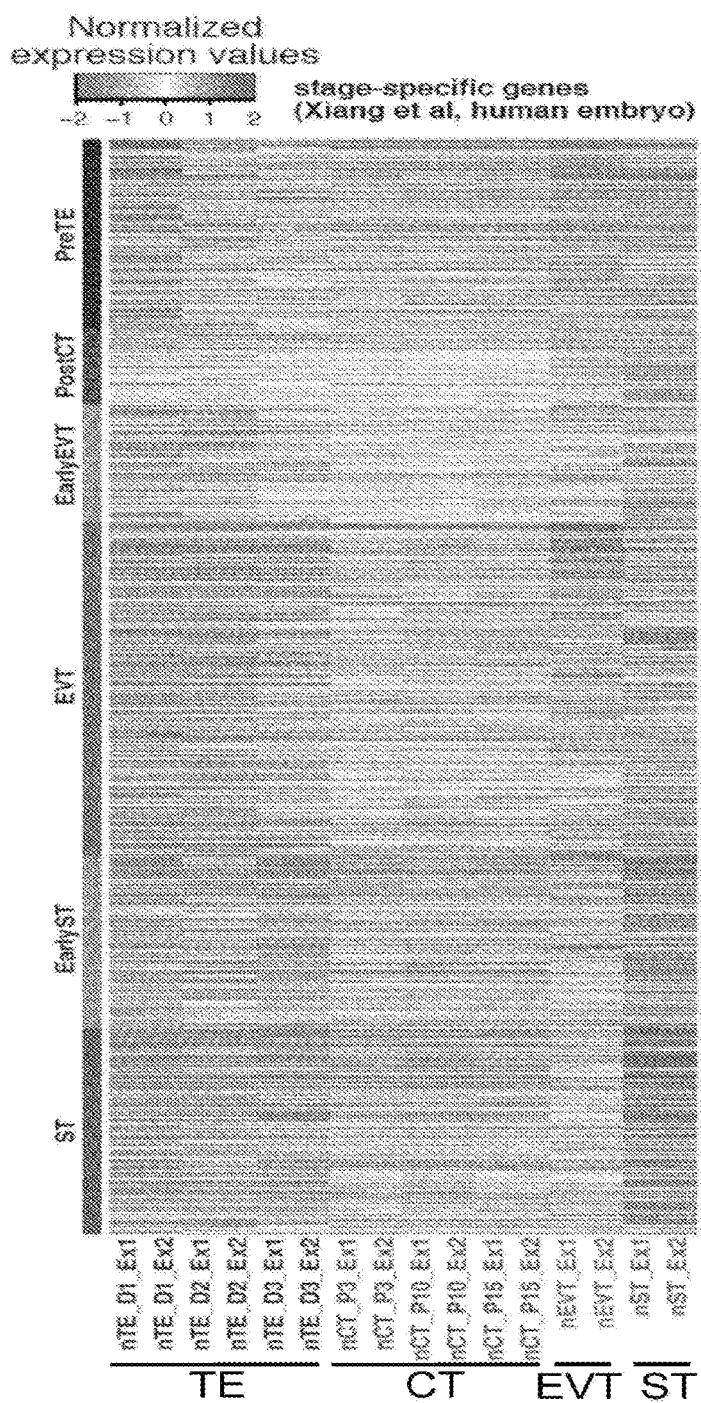
[図23]



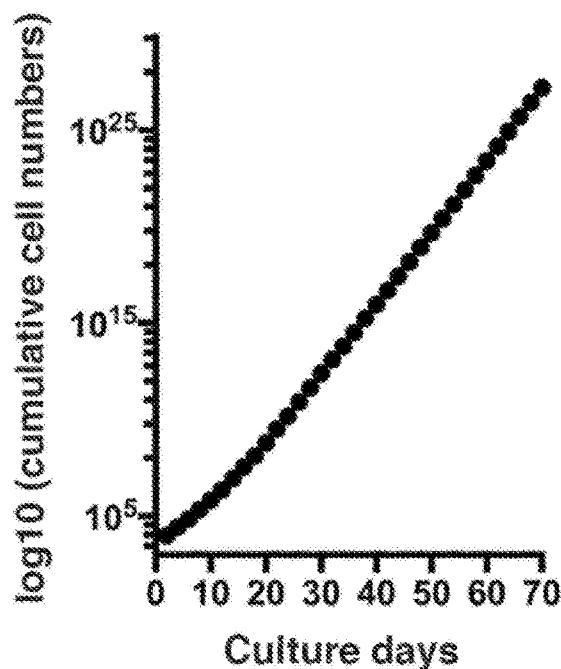
[図24]



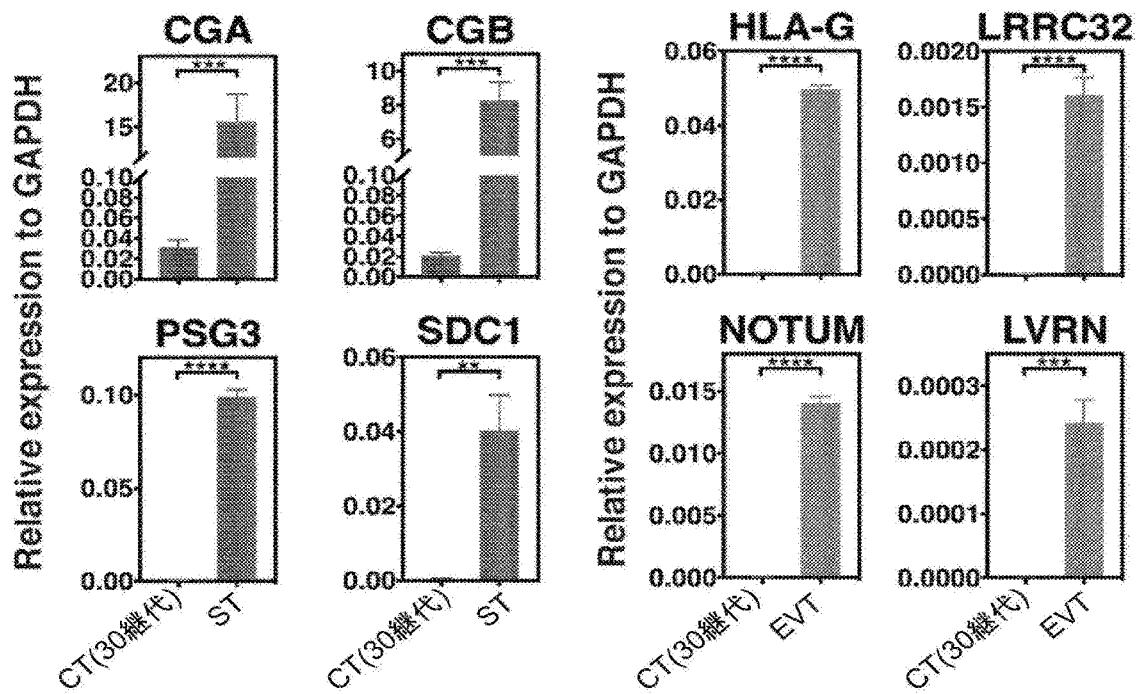
[図25]



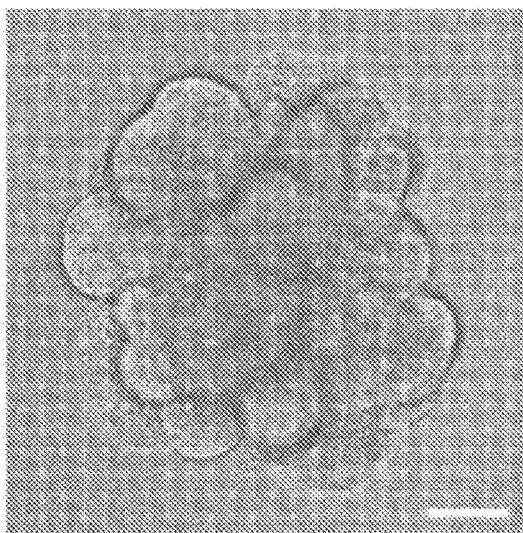
[図26]



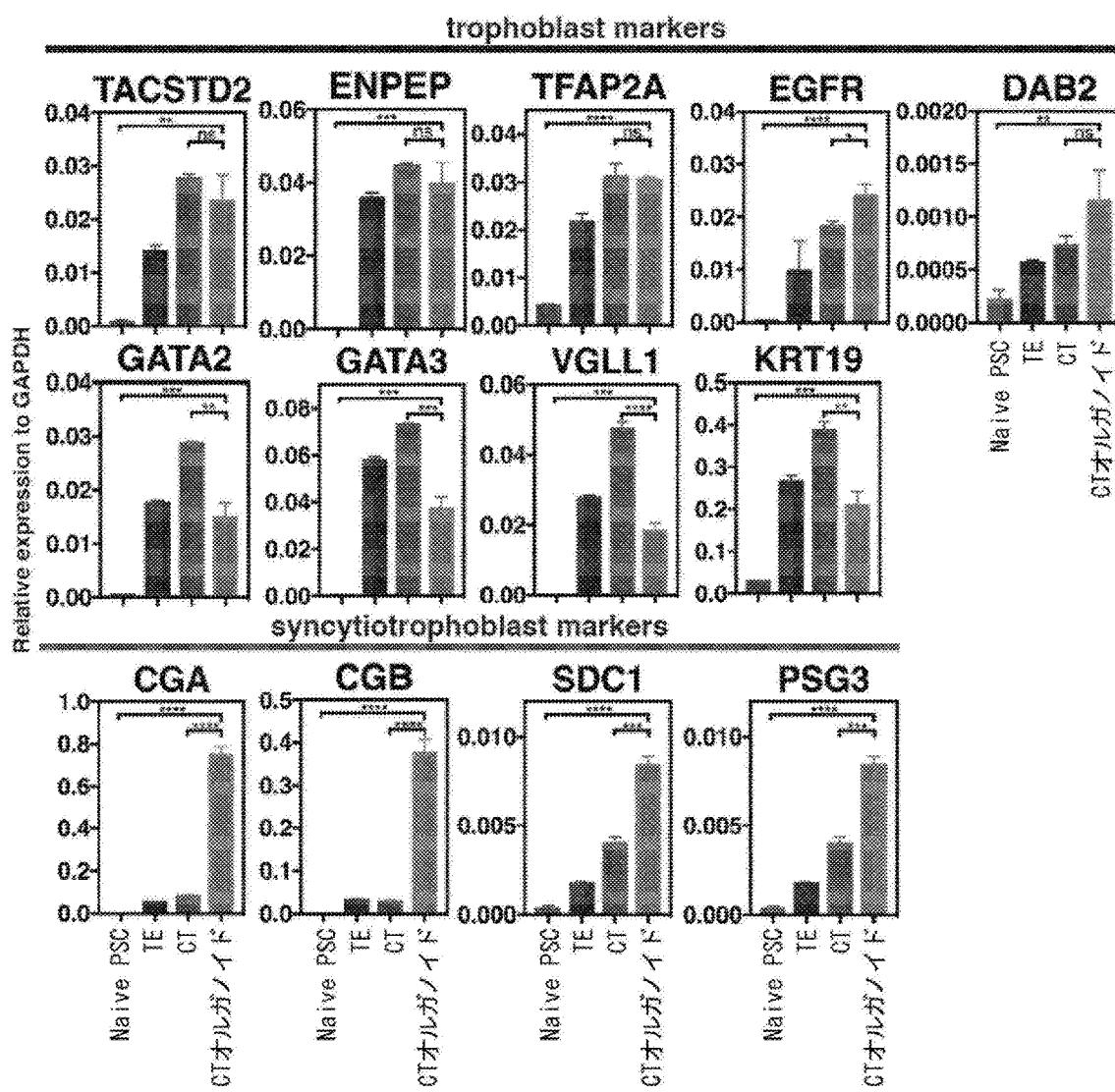
[図27]



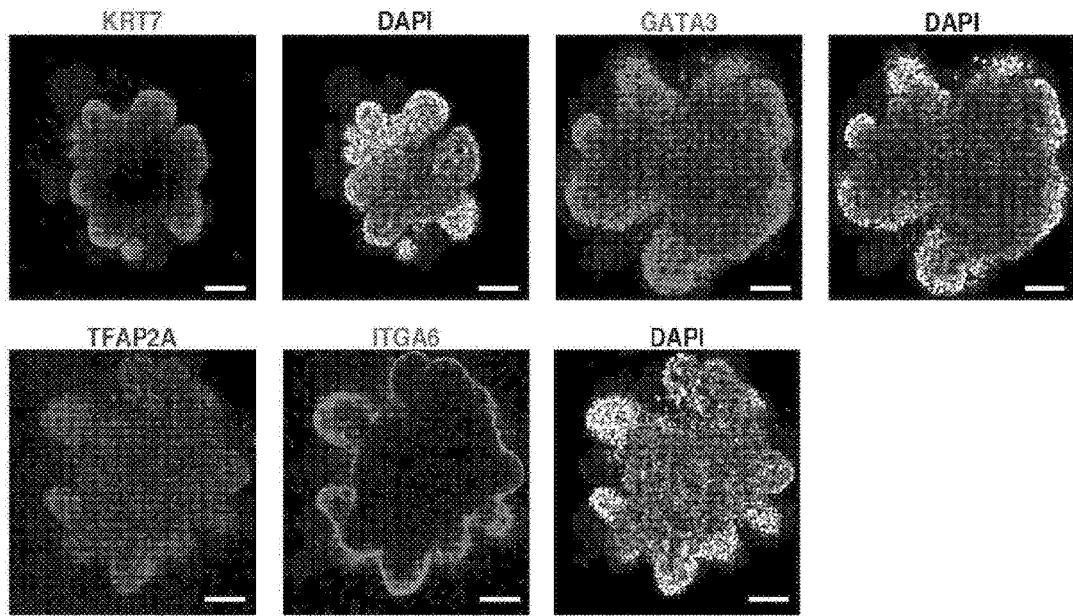
[図28]



[図29]



[図30]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/043328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071 (2010.01) i; C12N5/073 (2010.01) i; C12N5/0735 (2010.01) i;

C12N5/10 (2006.01) i

FI: C12N5/10; C12N5/071; C12N5/073; C12N5/0735

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021

Registered utility model specifications of Japan 1996-2021

Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 2019/0112573 A1 (UNIVERSITY OF MACAU) 18 April 2019 (2019-04-18) claims, paragraphs [0034]-[0035], examples entire text	1, 3, 5-6 2, 4, 7-9, 12, 16-17
Y A	池田 達彦 ほか, 応用利用に向けた低分子化合物によるヒト ips 細胞の 培養, ケミカルタイムズ, 2016, vol. 241, pp. 7-11 page 8, left column, line 17 to right column, line 3 from the bottom, table 1 entire text, (IKEDA, Tatsuhiko et al., "iPS cells cultivation with small molecules for application", THE CEMICAL TIMES)	1, 3, 5-6 2, 4, 7-9, 12, 16-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 January 2021 (28.01.2021)

Date of mailing of the international search report
09 February 2021 (09.02.2021)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/043328

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOEL, M. et al., "Optimizing bone morphogenic protein 4-mediated human embryonic stem cell differentiation into trophoblast-like cells using fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor- β /activin/nodal signalling inhibition", Reprod. Biomed. Online, 2017, vol. 35(3), pp. 253-263 page 254, right column, line 30 from the bottom to page 255, left column, line 2, page 257, right column, line 6 from the bottom to page 259, left column, line 11, fig. 1	1-9, 12, 16-17
A	WO 2016/186078 A1 (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 24 November 2016 (2016-11-24) claims	1-9, 12, 16-17
A	TAKASHIMA, Y. et al., "Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human", Cell, vol. 158(6), 2014, pp. 1254-1269 entire text	1-9, 12, 16-17
P, A	IO, S. et al., "Trophectoderm-like cells from human naive induced pluripotent stem cells model human placentation", 日本産科婦人科学会雑誌, 23 March 2020, vol. 72, p. S.154, abstract no. IS-WS-1-1 entire text (Journal of Japan Society of Obstetrics and Gynecology)	1-9, 12, 16-17
P, A	IO, S. et al., "Derivation of trophectoderm-like cells from human naive pluripotent stem cells", Reproductive Sciences, March 2020, vol. 27(1), Supp., p. 249A, abstract no. F-117 entire text	1-9, 12, 16-17
P, A	CINKORNPUMIN, J. K. et al., "Naive Human Embryonic Stem Cells Can Give Rise to Cells with a Trophoblast-like Transcriptome and Methylome", Stem Cell Reports, 14 July 2020, vol. 15(1), pp. 198-213 entire text	1-9, 12, 16-17
P, A	IO, S. et al., "New era of trophoblast research: integrating morphological and molecular approaches", Human reproduction update, 30 July 2020, vol. 26(5), pp. 611-633 entire text	1-9, 12, 16-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP 2020 / 043328

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Invention in claims 1–9, 12, and 16–17

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/043328

<Continuation of Box No. III>

(Invention 1) Claims 1-9, 12, and 16-17

Claims 1-9 and 12 have the special technical feature of a "method for producing trophectodermal cells *in vitro*, the method comprising a step for culturing naïve pluripotent stem cells in media containing at least two factors selected from among a TGF β inhibitor, an MEK inhibitor, a BMP inhibitor, and a JAK inhibitor to induce the differentiation into trophectodermal cells," and are thus classified as invention 1.

In addition, claims 16-17 are substantially identical or equivalent to claim 1 classified as invention 1, and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 10-11

It cannot be said that claims 10-11 have special technical features identical or corresponding to those of claims 1-9, 12, and 16-17 classified as invention 1.

Also, claims 10-11 are not dependent on any of the claims classified as invention 1. Furthermore, claims 10-11 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claims 10-11 cannot be classified as invention 1.

In addition, claims 10-11 have the special technical feature of a "method for producing cytotrophoblast cells, the method comprising: a step for providing trophectoderm; a step for including the differentiation of the trophectoderm into cytotrophoblast cells," and are thus classified as invention 2.

(Invention 3) Claims 13-15

Claims 13-15 cannot be considered to have special technical features identical or corresponding to those of claims 1-9, 12, and 16-17 classified as invention 1 or claims 10-11 classified as invention 2.

Also, claims 13-15 are not dependent on any of the claims classified as invention 1 or 2. Further, claims 13-15 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Therefore, claims 13-15 cannot be classified as either invention 1 or 2.

In addition, claims 13-15 have the special technical feature of "isolating trophectodermal cells from a cell population including trophectodermal cells," "detecting trophectodermal cells from a cell population including trophectodermal cells," or "detecting or selecting trophectodermal cells," and are thus classified as invention 3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/043328

(Invention 4) Claims 18-20

Claims 18-20 cannot be considered to have special technical features identical or corresponding to those of claims 1-9, 12, and 16-17 classified as invention 1, claims 10-11 classified as invention 2, or claims 13-15 classified as invention 3.

Also, claims 18-20 are not dependent on any of the claims classified as inventions 1-3. Furthermore, claims 18-20 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as inventions 1-3.

Therefore, claims 18-20 cannot be classified as any one of invention 1, invention 2, or invention 3.

In addition, claims 18-20 have the special technical feature of "isolating cytotrophoblast cells from a cell population including cytotrophoblast cells," "detecting cytotrophoblast cells from a cell population including cytotrophoblast cells," or "detecting or selecting cytotrophoblast cells," and are thus classified as invention 4.

(Invention 5) Claims 21-23

Claims 21-23 cannot be considered to have special technical features identical or corresponding to those of claims 1-9, 12, and 16-17 classified as invention 1, claims 10-11 classified as invention 2, claims 13-15 classified as invention 3, or claims 18-20 classified as invention 4.

Also, claims 21-23 are not dependent on any of the claims classified as inventions 1-4. Furthermore, claims 21-23 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as inventions 1-4.

Therefore, claims 21-23 cannot be classified as any one of invention 1, invention 2, invention 3, or invention 4.

In addition, claims 21-23 have the special technical feature of "isolating amnion cells from a cell population including amnion cells," "detecting amnion cells from a cell population including amnion cells," or "detecting or selecting amnion cells," and are thus classified as invention 5.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/043328

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2019/0112573 A1 WO 2016/186078 A1	18 Apr. 2019 24 Nov. 2016	(Family: none) US 2018/0135022 A1 claims	

国際調査報告

国際出願番号

PCT/JP2020/043328

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/073(2010.01)i; C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i
 FI: C12N5/10; C12N5/071; C12N5/073; C12N5/0735

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N5/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922 - 1996年
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	US 2019/0112573 A1 (UNIVERSITY OF MACAU) 18.04.2019 (2019-04-18) 特許請求の範囲、段落0034-0035、実施例	1, 3, 5-6
A	全文	2, 4, 7-9, 12, 16-17
Y	池田 達彦 ほか、応用利用に向けた低分子化合物によるヒトIPS細胞の培養、ケミカルタイムス、2016, Vol. 241, pp. 7-11 第8頁左欄第17行-同頁右欄下から第3行、表1	1, 3, 5-6
A	全文	2, 4, 7-9, 12, 16-17
A	KOEL, M. et al., Optimizing bone morphogenic protein 4-mediated human embryonic stem cell differentiation into trophoblast-like cells using fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor- β /activin/nodal signalling inhibition, Reprod. Biomed. Online, 2017, Vol. 35(3), pp. 253-263 第254頁右欄下から第30行-第255頁左欄第2行、第257頁右欄下から第6行-第259頁左欄第11行、図1	1-9, 12, 16-17
A	WO 2016/186078 A1 (住友化学株式会社) 24.11.2016 (2016-11-24) 特許請求の範囲	1-9, 12, 16-17

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“0” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

“X” 特に関連のある文献であつて、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であつて、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.01.2021

国際調査報告の発送日

09.02.2021

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

小田 浩代 4B 8377

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	TAKASHIMA, Y. et al., Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human, Cell, Vol. 158(6), 2014, pp. 1254-1269 全文	1-9, 12, 16-17
P, A	I0, S. et al., Trophectoderm-like cells from human naive induced pluripotent stem cells model human placenta, 日本産科婦人科学会雑誌, 2020.03.23, Vol. 72, p. S.154, Abstract No. IS-WS-1-1 全文	1-9, 12, 16-17
P, A	I0, S. et al., Derivation of trophectoderm-like cells from human naive pluripotent stem cells, Reproductive Sciences, 2020.03, Vol. 27(1), Supp., p. 249A, Abstract No. F-117 全文	1-9, 12, 16-17
P, A	CINKORN PUMIN, J. K. et al., Naive Human Embryonic Stem Cells Can Give Rise to Cells with a Trophoblast-like Transcriptome and Methylome, Stem Cell Reports, 2020.07.14, Vol. 15(1), pp. 198-213 全文	1-9, 12, 16-17
P, A	I0, S. et al., New era of trophoblast research: integrating morphological and molecular approaches, Human reproduction update, 2020.07.30, Vol. 26(5), pp. 611-633 全文	1-9, 12, 16-17

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。
請求項1-9、12及び16-17に係る発明

- 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立て手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
 - 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立て手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかつた。
 - 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかつた。

第III欄

発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(発明1) 請求項1-9、12、16-17

請求項1-9及び12は、「栄養外胚葉細胞をインビトロで製造する方法であって、ナイーブ型多能性幹細胞を、TGF β 阻害剤、MEK阻害剤、BMPおよびJAK阻害剤から選択される2種以上の因子を含む培地で培養して栄養外胚葉細胞へ分化誘導する工程を含む方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

また、請求項16-17は、発明1に区分された請求項1と、実質同一又はそれに準ずる関係にあるので、発明1に区分する。

(発明2) 請求項10-11

請求項10-11は、発明1に区分された請求項1-9、12及び16-17と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項10-11は、発明1に区分されたいずれの請求項の従属請求項でもない。さらに、請求項10-11は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係はない。

したがって、請求項10-11は、発明1に区分できない。

そして、請求項10-11は、「栄養外胚葉を提供する工程、及び、当該栄養外胚葉を細胞性栄養膜細胞に分化誘導する工程を含む、細胞性栄養膜細胞の製造方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

(発明3) 請求項13-15

請求項13-15は、発明1に区分された請求項1-9、12及び16-17、又は、発明2に区分された請求項10-11と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項13-15は、発明1又は2に区分されたいずれの請求項の従属請求項でもない。さらに、請求項13-15は、発明1又は2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係はない。

したがって、請求項13-15は、発明1及び2のいずれにも区分できない。

そして、請求項13-15は、「栄養外胚葉細胞を含む細胞集団から、栄養外胚葉細胞を分離する」、「栄養外胚葉細胞を含む細胞集団において、栄養外胚葉細胞を検出する」、又は、「栄養外胚葉細胞検出または選別」という特別な技術的特徴を有しているので、発明3に区分する。

(発明4) 請求項18-20

請求項18-20は、発明1に区分された請求項1-9、12及び16-17、発明2に区分された請求項10-11、又は、発明3に区分された請求項13-15と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項18-20は、発明1-3に区分されたいずれの請求項の従属請求項でもない。さらに、請求項18-20は、発明1-3に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係はない。

したがって、請求項18-20は、発明1-3のいずれにも区分できない。

そして、請求項18-20は、「細胞性栄養膜細胞を含む細胞集団から細胞性栄養膜細胞を分離する」、「細胞性栄養膜細胞を含む細胞集団から細胞性栄養膜細胞を検出する」、又は、「細胞性栄養膜細胞の検出または選別」という特別な技術的特徴を有しているので、発明4に区分する。

(発明5) 請求項21-23

請求項21-23は、発明1に区分された請求項1-9、12及び16-17、発明2に区分された請求項10-11、発明3に区分された請求項13-15、又は、発明4に区分された請求項18-20と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項21-23は、発明1-4に区分されたいずれの請求項の従属請求項でもない。さらに、請求項21-23は、発明1-4に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係はない。

したがって、請求項21-23は、発明1-4のいずれにも区分できない。

そして、請求項21-23は、「羊膜細胞を含む細胞集団から羊膜細胞を分離する」、「羊膜細胞を含む細胞集団から羊膜細胞を検出する」、又は、「羊膜細胞の検出または選別」という特別な技術的特徴を有しているので、発明5に区分する。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/043328

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2019/0112573 A1	18.04.2019	(ファミリーなし)	
WO 2016/186078 A1	24.11.2016	US 2018/0135022 A1 特許請求の範囲	